

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 03 février 2000 (03.02.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/00843	Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98015
Date du dépôt international (jour/mois/année) 12 avril 1999 (12.04.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 15 avril 1998 (15.04.98)
Déposant LAMBERTY, Mireille etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

10 novembre 1999 (10.11.99)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.
Boîte postale 9163
F-69263 Lyon cedex 09
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 16 mars 2000 (16.03.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98015	
Demande internationale no PCT/FR99/00843	Date du dépôt international (jour/mois/année) 12 avril 1999 (12.04.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse RHONE-POULENC AGRO 14-20, rue Pierre Baizet F-69009 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☒ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse AVENTIS CROPS SCIENCE S.A. 14-20, rue Pierre Baizet F-69009 Lyon FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

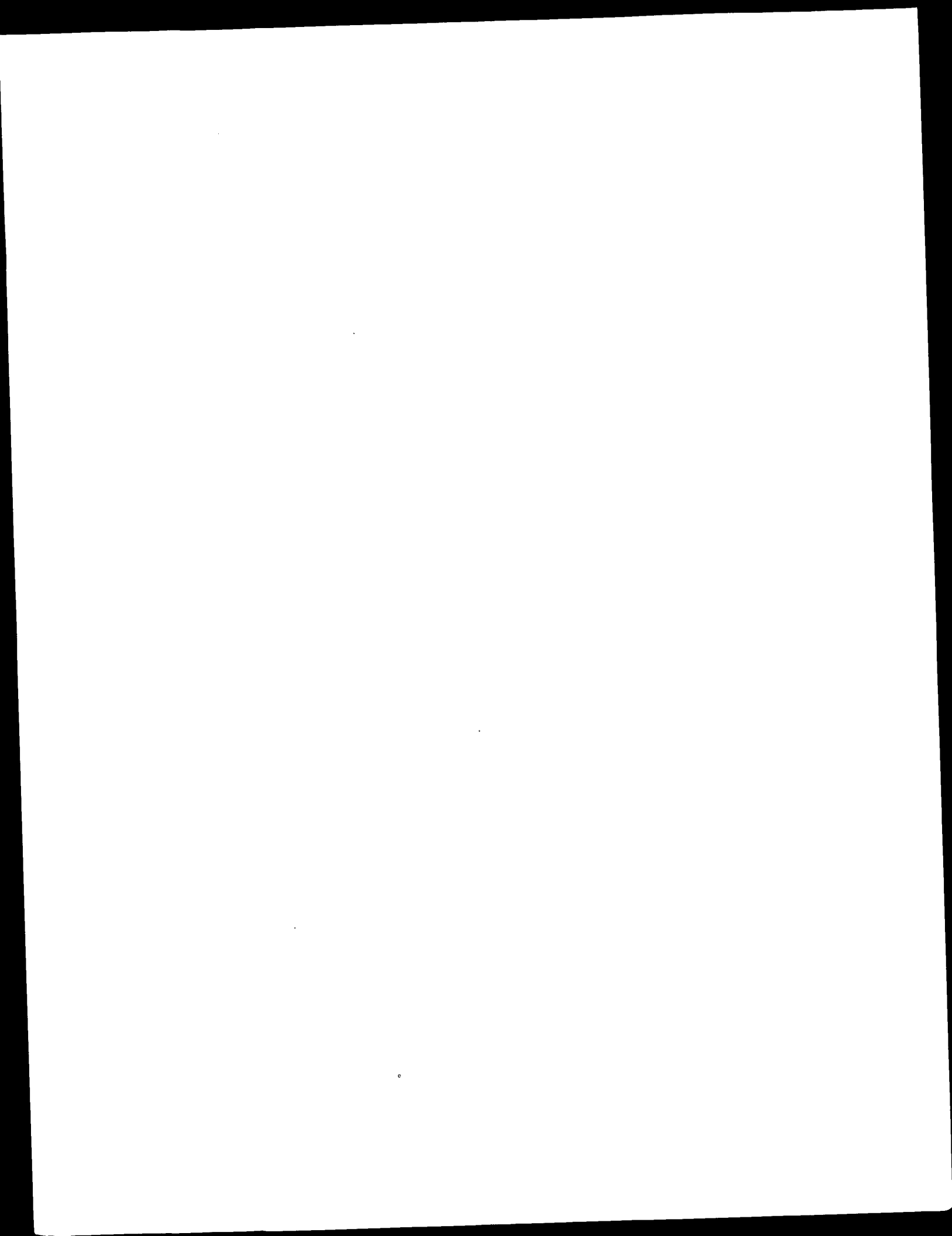
3. Observations complémentaires, le cas échéant:

Le changement de nom est valable également pour le représentant commun.

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Ellen Moyse no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---



PATENT COOPERATION TREATY

PCT/FR99/00843

PCT

NOTIFICATION OF THE REGISTRATION OF A CHANGE

(PCT Rule 92a.1 and administrative instruction 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.
Boîte postale 9163
F-69263 Lyon cedex 09
FRANCE

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)		IMPORTANT NOTIFICATION									
Applicant's or agent's file reference PH 98015											
International application No. PCT/FR99/00843		International filing date (day/month/year) 12 April 1999 (12.04.99)									
1. The following information was registered with respect to: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative											
Name and address RHONE-POULENC AGRO 14-20, rue Pierre Baizet F-69009 Lyon FRANCE		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Nationality (name of State) FR</td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Residence (name of State) FR</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 5px;">Telephone No.</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 5px;">Facsimile No.</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 5px;">Teleprinter No.</td> </tr> </table>		Nationality (name of State) FR	Residence (name of State) FR	Telephone No.		Facsimile No.		Teleprinter No.	
Nationality (name of State) FR	Residence (name of State) FR										
Telephone No.											
Facsimile No.											
Teleprinter No.											
2. The International Bureau notifies the applicant that the change indicated below has been registered with respect to: <input type="checkbox"/> the person <input checked="" type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence											
Name and address AVENTIS CROPS SCIENCE S.A. 14-20, rue Pierre Baizet F-69009 Lyon FRANCE		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Nationality (name of State) FR</td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Residence (name of State) FR</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 5px;">Telephone No.</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 5px;">Facsimile No.</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 5px;">Teleprinter No.</td> </tr> </table>		Nationality (name of State) FR	Residence (name of State) FR	Telephone No.		Facsimile No.		Teleprinter No.	
Nationality (name of State) FR	Residence (name of State) FR										
Telephone No.											
Facsimile No.											
Teleprinter No.											
3. Supplementary observations, if appropriate: The change of name is also valid for joint representative.											
4. A copy of this notification has been sent to <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> the Receiving Office</td> <td><input type="checkbox"/> the designated Offices concerned</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> the International Searching Authority</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examination Authority</td> <td><input type="checkbox"/> others:</td> </tr> </table>				<input checked="" type="checkbox"/> the Receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examination Authority	<input type="checkbox"/> others:		
<input checked="" type="checkbox"/> the Receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned										
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned										
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examination Authority	<input type="checkbox"/> others:										

<p style="text-align: center;">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p style="text-align: right;">(signature) Ellen Moyse</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---

5020
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

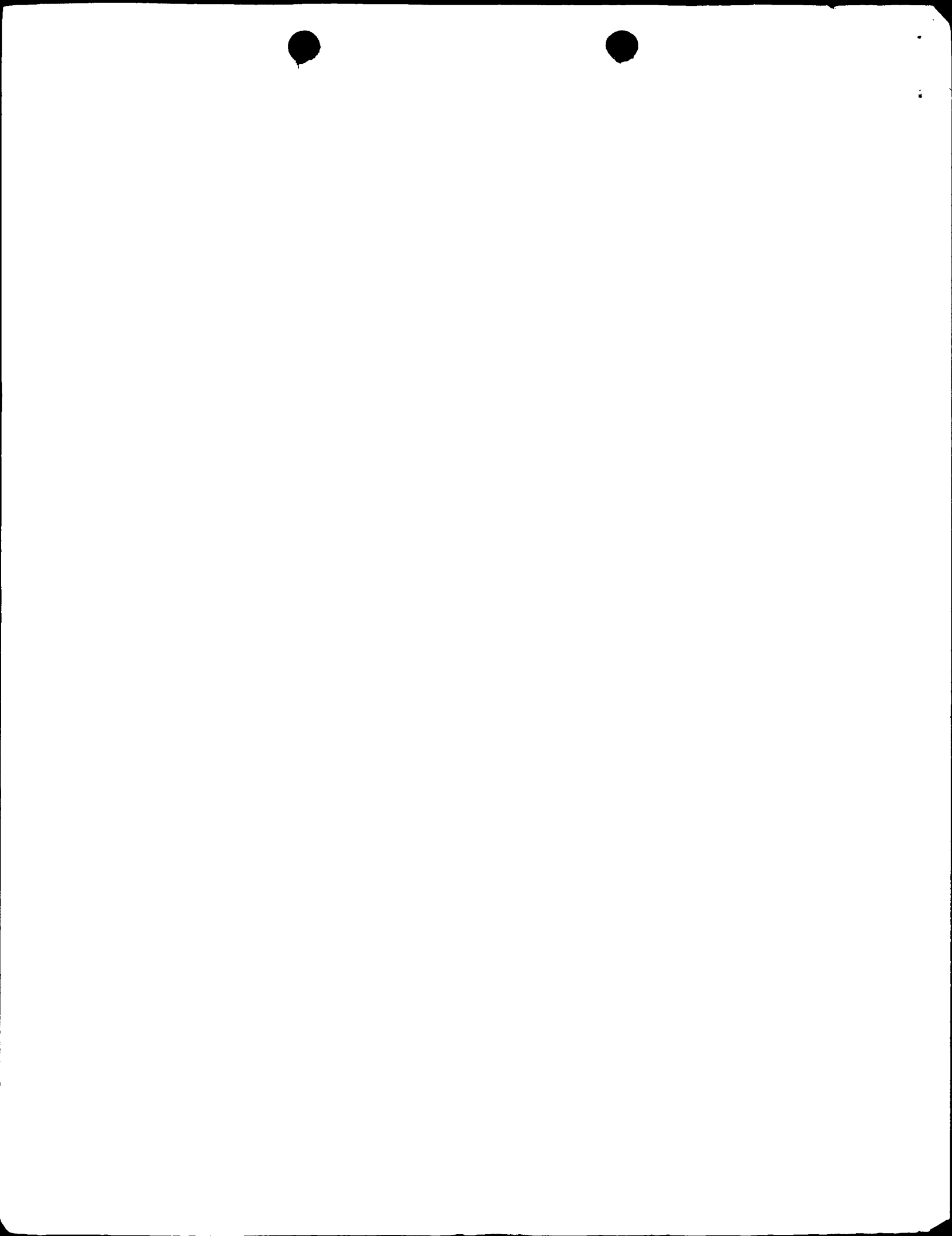
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH 98015	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/00843	International filing date (day/month/year) 12 April 1999 (12.04.99)	Priority date (day/month/year) 15 April 1998 (15.04.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12		
Applicant AVENTIS CROPSCIENCE S.A.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 10 November 1999 (10.11.99)	Date of completion of this report 26 July 2000 (26.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/00843

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-38, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-46, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/2-2/2, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/00843**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-46	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-46	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-46	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

D1: FR-A-2 695 392 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11 March 1994 (1994/03/11)

D2: WO 90 11770 A (CALGENE INC) 18 October 1990 (1990/10/18)

D3: HOFFMANN J A ET AL.: 'Insect defensins: inducible antibacterial peptides' IMMUNOLOGY TODAY., vol. 13, no. 10, 1992, pages 411-415, XP002089181 CAMBRIDGE GB

2. The heliomycin polypeptides described in claim 1 appear to be novel in so far as they describe primary sequences that are different from the molecules described in documents D1 and D2. As for the defensins mentioned in D1 and D2, the molecules derived from formula (I) comprise variations in the length of the peptide fragments positioned between each of the six characteristic cysteines of the molecule.

3. The molecules in the "defensins" class are known to a person skilled in the art, as evidenced by documents D1 or D2. The heliomycin is a polypeptide

belonging to the same family described in the prior art. Said peptide has been purified from the hemolymph of immunized *H. virescens* lepidoptera larvae and is characterized, like all the members of its family, by its primary structure which is rich with cysteine radicals forming intra-chain disulfide bridges.

Document D1, which is considered the closest prior art, describes anti-bacterial peptides belonging to the defensins family and derived from insect larvae (e.g. *Phormia terranova*).

The defensins that are the subject matter of claim 1 appear to be novel since they differ from the prior art by their primary structure and by the specific size of certain inter-cysteine peptide segments. Nevertheless, the structural skeleton thereof is a constant in this class of molecules due to the intra-chain disulfide bridges between the cysteines (arrangement described in D3, page 413).

The problem addressed by the present invention can therefore be considered that of achieving alternative insect defensin molecules with antimicrobial properties.

The solution proposed in claims 1-46 of the present application is not considered inventive (PCT Article 33(3)), for the following reasons:

The antifungal and antibacterial properties of the defensins are known from the prior art, as evidenced in document D2 (page 13, lines 21-26 and tables 1 and 2, page 22-23).

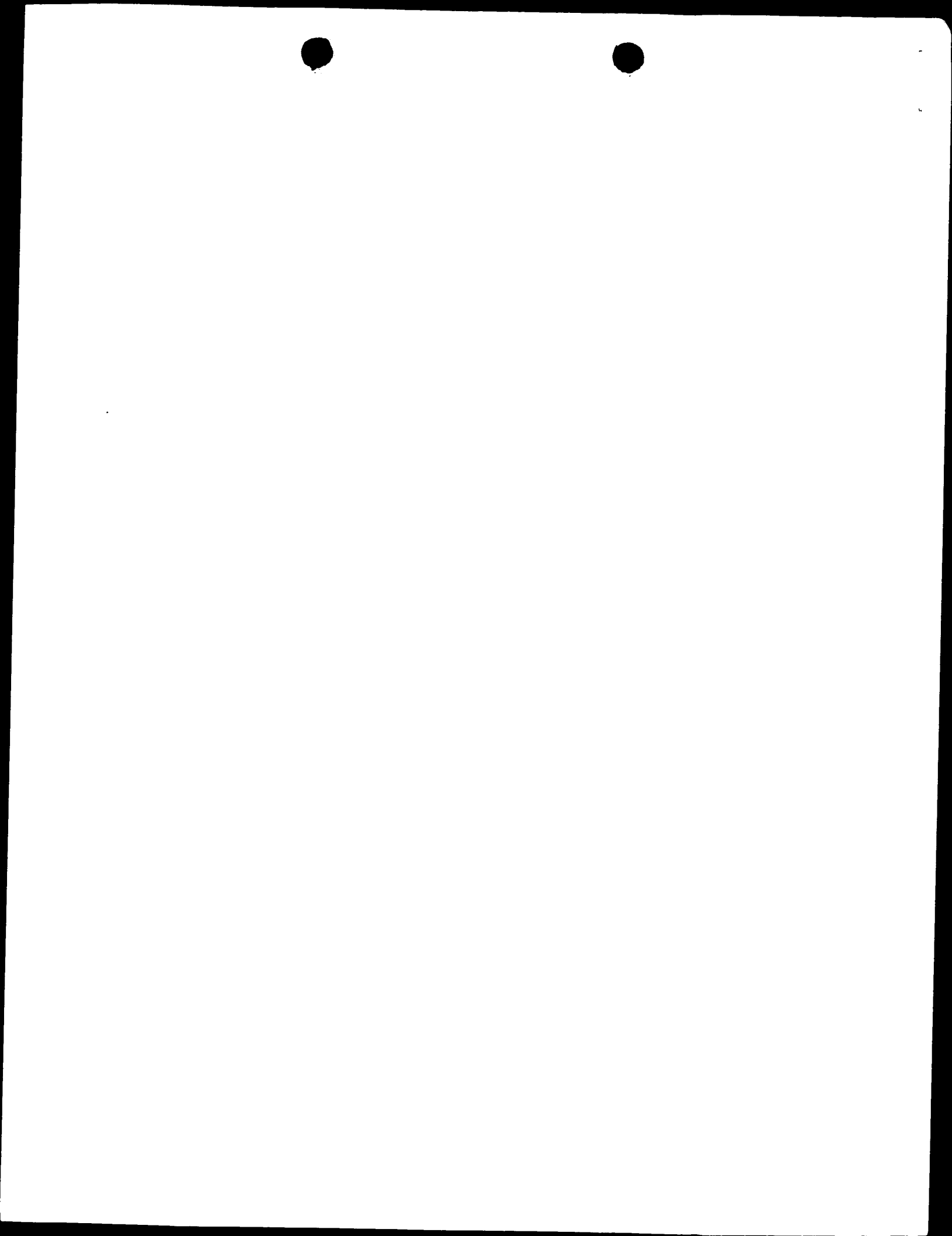
To find a solution to the stated technical problem, a person skilled in the art would obviously be led

to use the information provided in document D1. Indeed, a person skilled in the art would be prompted to select different insect larvae in order to immunize them against known pathogens, with the aim of purifying novel defensins from collected hemolymph.

Furthermore, owing to the alignment of the primary sequences of different members within the defensins class (see example in figure 1, D3, page 412), it is clear to a person skilled in the art that the structural constant imposed by the disulfide bridges is important for the biological activity of the defensins. Such an alignment also shows that there is a possible variation in the size of the fragments between each cysteine. The inevitable result is a formula (I) type "consensus" formula in which the size of the peptide fragments positioned between each of the six characteristic cysteines of the molecule is not rigidly attached. For this reason, searching for fragments of variable lengths between each cysteine radical (example: X_{ab} , X_{ac} , X_{ad} , ...) is an obvious step for a person skilled in the art who wishes to achieve novel active variants.

Therefore, in the absence of any novel, unexpected technical effect (said variants all have the same antimicrobial activities known from the prior art), achieving and purifying novel insect larvae defensins does not involve an inventive step within the meaning of PCT Article 33(3).

The achieving of fusion peptides, the use of the biological properties of peptides as well as the methods for transforming plant cells or heliomyacin production is part of the standard practice of a

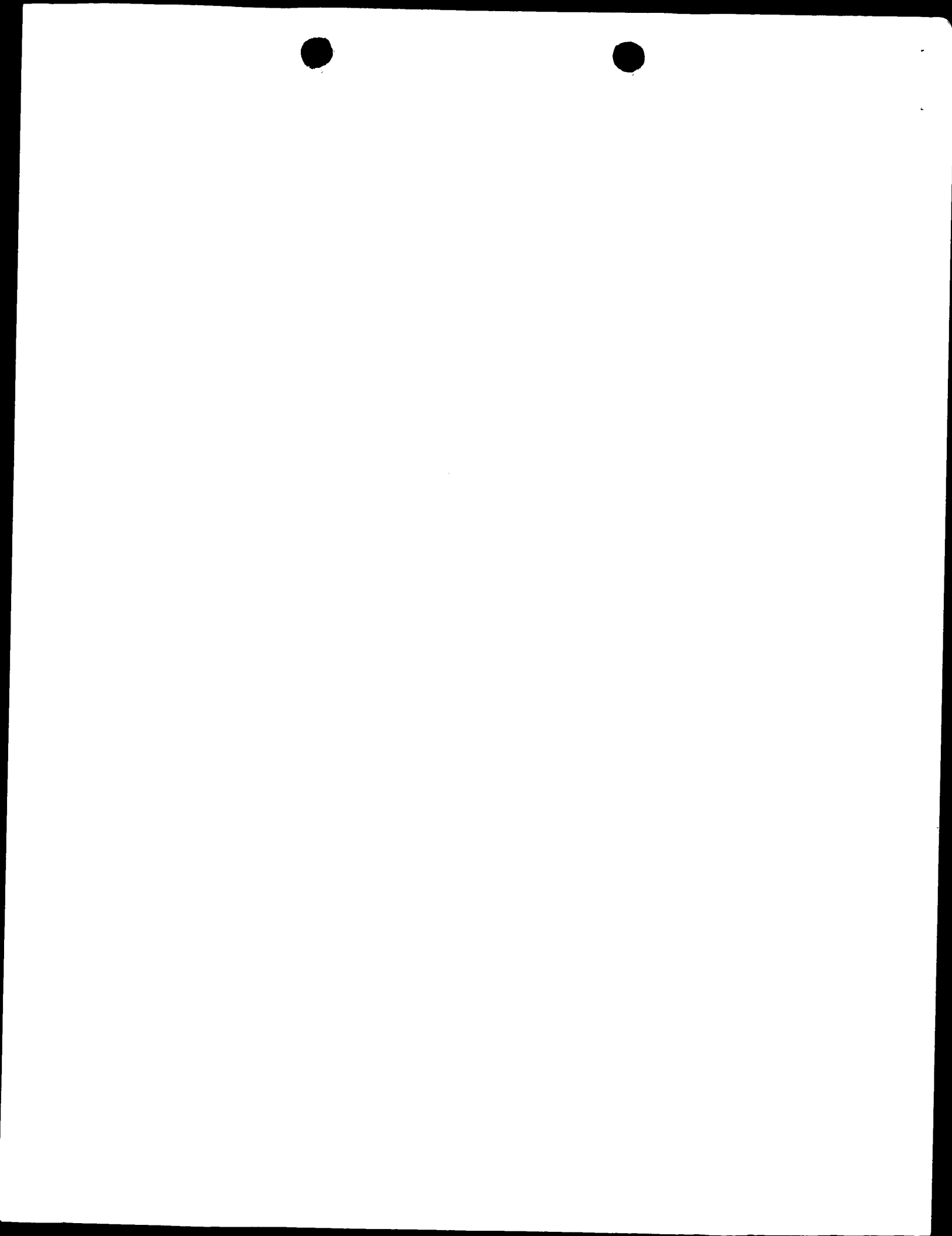


INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/00843

person skilled in the art and does not involve an inventive step.

For this reason, claims 1-46 are not considered to involve an inventive step within the meaning of PCT Article 33(3).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/00843

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the relevant prior art disclosed in documents D1 and D2 has not been indicated in the description.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. In claims 10 and 44, the references to previous claims appears to be incorrect. For example, claim 10 refers to itself and claim 44 refers to a method according to claim 33, which is a host organism (it must be referring to the method of claim 43).
2. The expression "fusion peptide" of claim 17 is vague and open to interpretation. The peptide in question could be characterized by unambiguous technical components.
3. Moreover, it should be noted that almost none the variants claimed by formula (I) in claim 1 have been synthesized or tested in the description to prove the anti-microbial activity thereof.

TRAITE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire:

RHONE-POULENC AGRO
Boîte postale 9163
F-69263 Lyon cedex 09
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 05 mai 1999 (05.05.99)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98015	
Demande internationale no PCT/FR99/00843	
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 12 avril 1999 (12.04.99)	
Date de priorité (jour/mois/année) 15 avril 1998 (15.04.98)	
Déposant RHONE-POULENC AGRO etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un **astérisque(*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les **lettres "NR"** figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
15 avri 1998 (15.04.98)	98/04933	FR	27 avri 1999 (27.04.99)

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

D. Mülhausen
Dorothee Mülhausen

no de téléphone (41-22) 338.83.38



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

WO 99/53053
PCT/FR99/00843

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Destinataire:
RHONE-POULENC AGRO
Boîte postale 9163
F-69263 Lyon cedex 09
FRANCE

REÇU D.P.I.

28 OCT. 1999

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 octobre 1999 (21.10.99)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98015		
AVIS IMPORTANT		
Demande internationale no PCT/FR99/00843	Date du dépôt international (jour/mois/année) 12 avril 1999 (12.04.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 15 avril 1998 (15.04.98)
Déposant RHONE-POULENC AGRO etc		

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1a-bis)).
3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 21 octobre 1999 (21.10.99) sous le numéro WO 99/53053

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

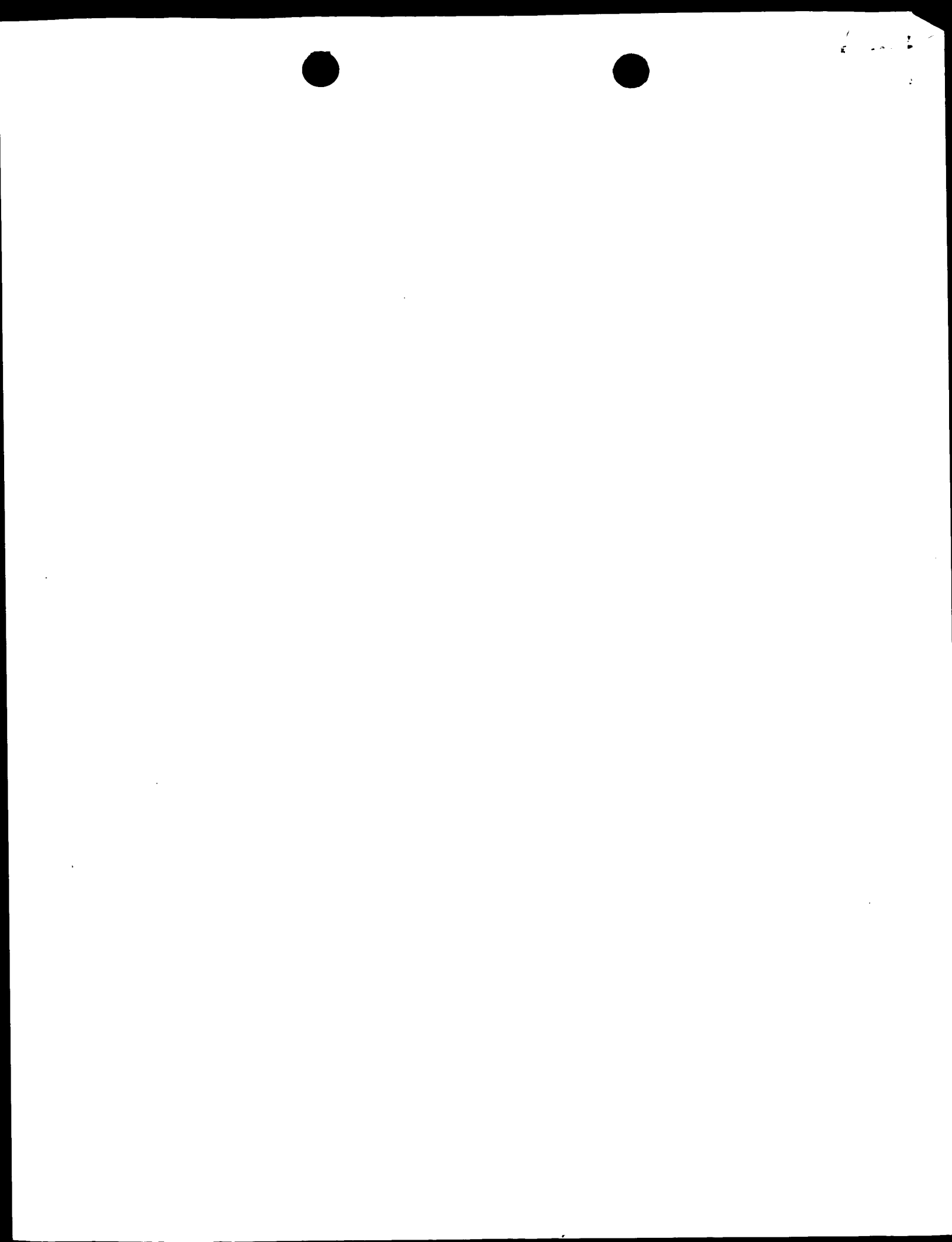
Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

Suite du formulaire PCT/IB/308

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE
LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 octobre 1999 (21.10.99)	AVIS IMPORTANT
Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98015	Demande internationale no PCT/FR99/00843
<p>Il est notifié au déposant que, au moment de l'établissement du présent avis, le délai fixé à la règle 46.1 pour le dépôt de modifications selon l'article 19 n'était pas encore expiré et que le Bureau international n'avait pas reçu de modifications ni de déclaration l'informant que le déposant ne souhaitait pas présenter de modifications.</p>	



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 31 JUL 2000

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98015	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/00843	Date du dépôt international (jour/mois/année) 12/04/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 15/04/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/12		
Déposant RHONE-POULENC AGRO et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 10/11/1999	Date d'achèvement du présent rapport 26.07.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Vix, O N° de téléphone +49 89 2399 7326 



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00843

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après *(les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.)* :

Description, pages:

1-38 version initiale

Revendications, N°:

1-46 version initiale

Dessins, feuilles:

1/2-2/2 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00843

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-46
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-46
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-46
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée



Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: FR-A-2 695 392 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE)
11 mars 1994 (1994-03-11)
D2: WO 90 11770 A (CALGENE INC) 18 octobre 1990 (1990-10-18)
D3: HOFFMANN J A ET AL.: 'Insect defensins: inducible antibacterial peptides'
IMMUNOLOGY TODAY., vol. 13, no. 10, 1992, pages 411-415, XP002089181
CAMBRIDGE GB

2. Les polypeptides d'héliomicine décrits dans la revendication 1 apparaissent nouveaux dans la mesure où ils décrivent des séquences primaires distinctes des molécules décrites dans les documents D1-D2. Par rapport aux défensines mentionnées en D1-D2, les molécules dérivées de la formule (I) comporte des variations dans la longueur des fragments peptidiques situés entre chacune des six cystéines caractéristiques de la molécule.
3. Les molécules de la classe des "défensines" sont connues par l'homme de métier comme le révèle les documents D1 ou D2. L'héliomicine est un polypeptide appartenant à cette même famille décrite dans l'art antérieur. Ce peptide a été purifié à partir de l'hémolymphe de larves immunisées du lépidoptère *H. virescens* et se caractérise, comme tous les membres de sa famille, par sa structure primaire riche en résidus cystéine formant des ponts disulfure intra-chaîne.
- Le document D1, qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit des peptides antibactérien dérivés de larves d'insectes (e.g. *Phormia terranova*) appartenant à la famille des défensines.
- Les défensines qui font l'objet de la revendication 1 apparaissent nouvelles car elles se distinguent de l'art antérieur dans leur structure primaire par la taille spécifique de certains segments peptidiques inter-cystéines. Néanmoins, leur squelette structural est une constante pour cette classe de molécules du fait de l'existence des ponts disulfure intra-chaîne entre les cystéines (arrangement décrit en D3, page 413).



RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR99/00843

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme étant l'obtention d'alternatives de molécules de défensines d'insectes ayant des propriétés antimicrobienne.

La solution proposée dans les revendication 1-46 de la présente demande n'est pas considérée comme inventive (article 33(3) PCT) pour les raisons suivantes:

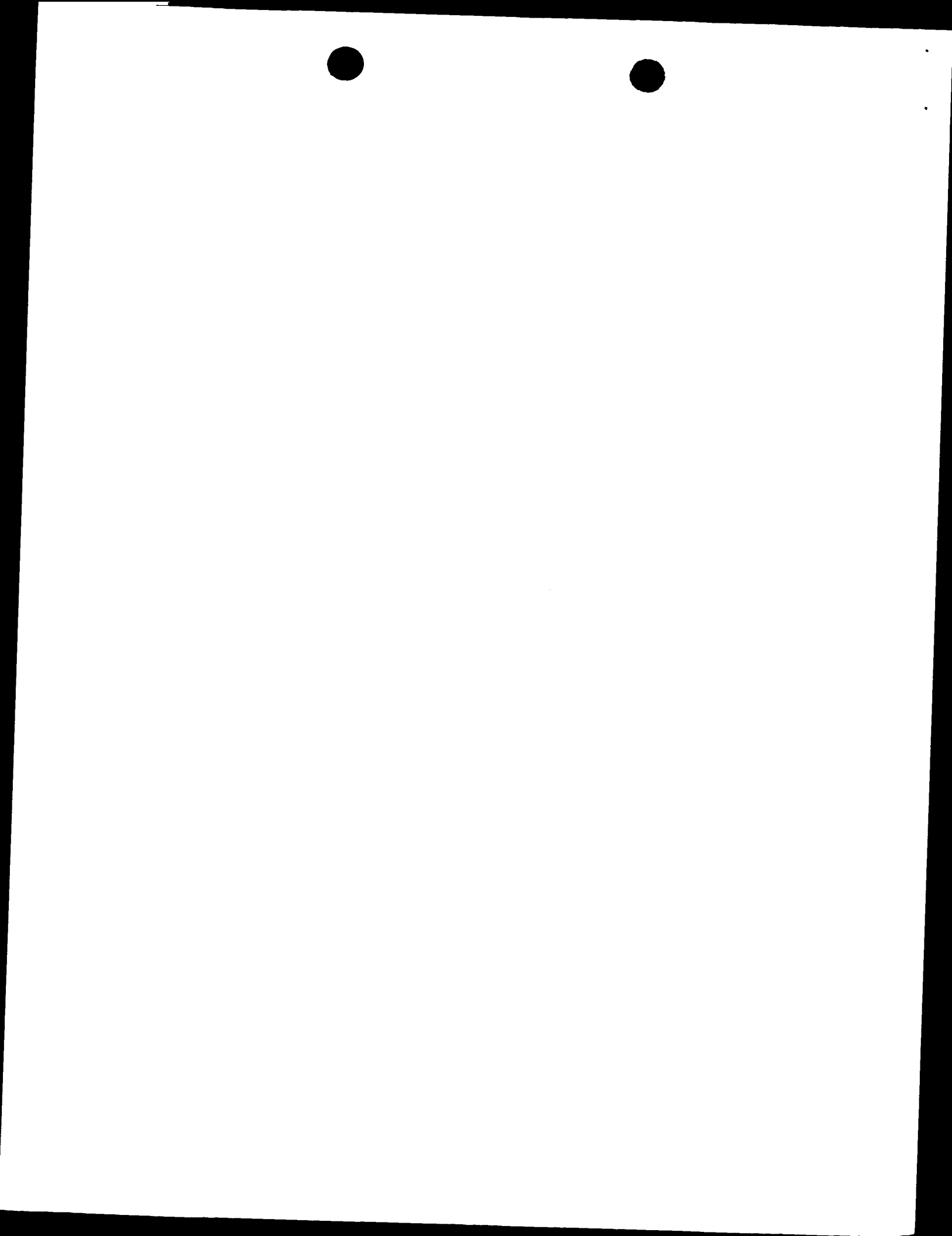
Les propriétés antifongique et antibactérienne des défensines étaient connues dans l'art antérieur, comme en atteste le document D2 (page 13, lignes 21-26 et tableaux 1 et 2 page 22-23).

Pour apporter une solution au problème technique posé, l'homme de métier serait amené d'une manière évidente à utiliser les informations fournies par le document D1. En effet, l'homme de métier serait amené à choisir différentes larves d'insectes pour les immuniser contre des pathogènes connus, ceci dans le but de purifier de nouvelles défensines à partir de l'hémolymphée recueillie.

De plus, grâce à l'alignement des séquences primaires de différents membres au sein de la classe des défensines (voir exemple en Fig 1 D3, page 412), il est clair pour l'homme de métier que la constante structurale imposée par les ponts disulfure est importante pour l'activité biologique des défensines. Un tel alignement montre également qu'il existe une variation possible pour la taille des fragments entre chaque cystéine. Il en dérive inévitablement une formule "consensus" du type de la formule (I) dans laquelle la taille des fragments peptidiques situés entre chacune des six cystéines caractéristiques de la molécule n'est pas fixée d'une manière rigide. C'est pourquoi la recherche de fragments de longueur variable entre chaque résidu cystéine (exemple: X_{ab} , X_{ac} , X_{ad} , ...) relève d'une démarche évidente pour l'homme de métier désireux d'obtenir de nouveaux variants actifs.

Par conséquent, en absence de tout nouvel effet technique inattendu (ces variants possèdent tous les mêmes activités antimicrobienne connues dans l'art antérieur), l'obtention et la purification de nouvelles défensines de larves d'insecte n'implique pas une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT.

L'obtention de peptides de fusion, l'utilisation des propriétés biologique des peptides ainsi que les procédés de transformation de cellules de plantes ou de production d'héliomicine relève de la pratique courante de l'homme de métier et ne présente pas



d'activité inventive.

C'est pourquoi les revendications 1-46 ne sont pas considérées comme présentant une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT.

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1 et D2.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

1. Dans les revendications 10 et 44 les références aux revendications antérieures semble erronées. Ainsi la revendication 10 se réfère à elle même et la revendication 44 se réfère à un procédé selon la revendication 33 qui est un organisme hôte (il doit s'agir du procédé de la revendication 43).
2. La formulation "peptide de fusion" de la revendication 17 est vague et ouverte à interprétation. Le peptide en question pourrait être caractérisé par des éléments techniques non ambigus.
3. De plus, il est à remarquer que la quasi-totalité des variants revendiqués par la formule (I) dans la revendication 1 n'ont pas été synthétisés, ni testés dans la description pour attester de leur activité anti-microbienne.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/FR 99/00843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/82 A61K38/17 C12P21/02
C12N15/62 C12N15/81

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 695 392 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11 March 1994 (1994-03-11) page 1, line 33 - page 7, line 2	1-4, 8, 11, 21, 22, 46 13, 14, 25
Y	---	
X	WO 90 11770 A (CALGENE INC) 18 October 1990 (1990-10-18) page 1 - page 19	1-4, 8, 11, 17, 18, 21-24, 28-46
X	FR 2 725 992 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 26 April 1996 (1996-04-26) cited in the application the whole document	1-4, 8, 11, 21, 22

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 August 1999

Date of mailing of the international search report

13/09/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

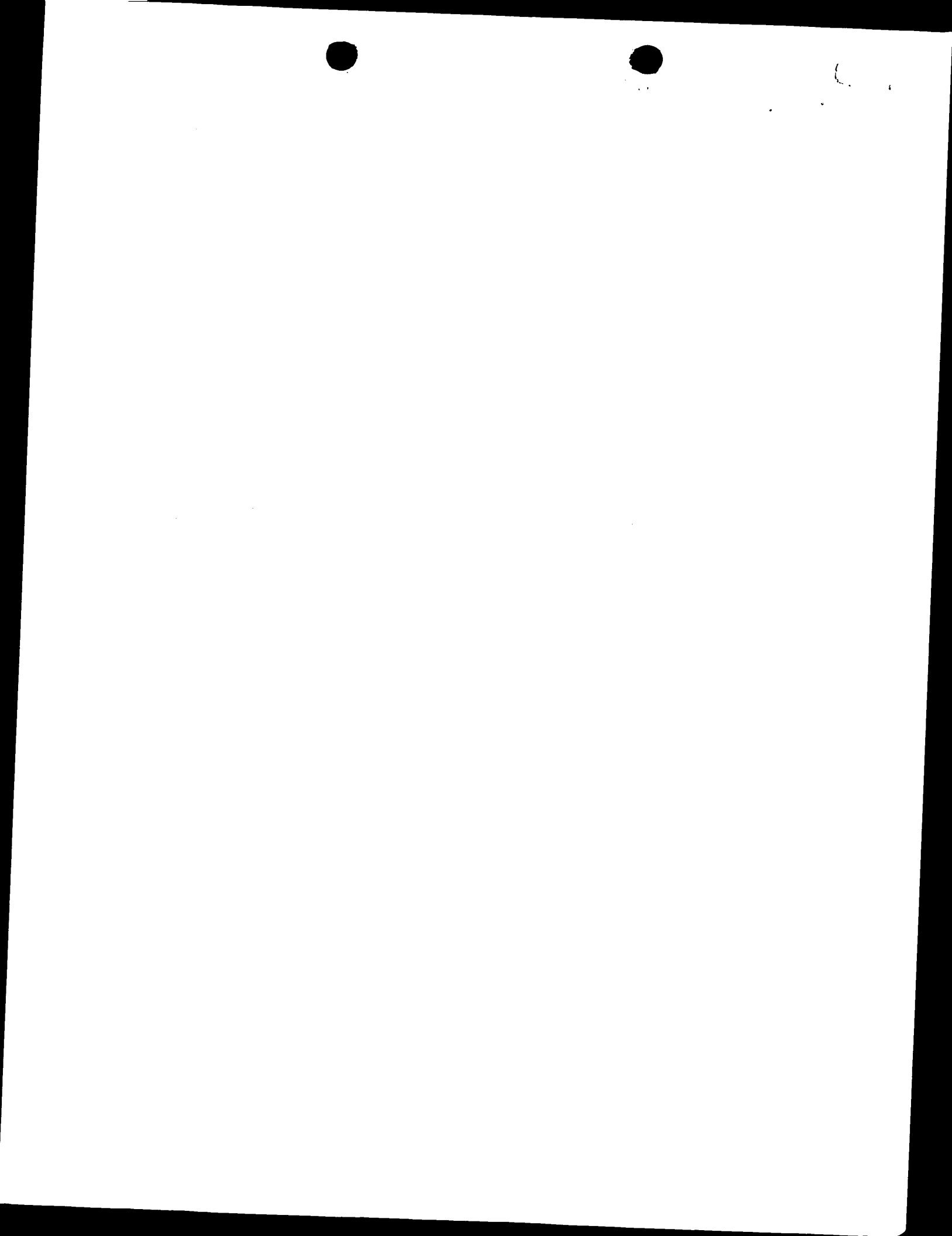
De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00843

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHUNG K T ET AL: "Antibacterial factors in immune hemolymph from heliothis virescens larvae" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 96, no. 0, 19 May 1996 (1996-05-19), page 275 XP002089180 WASHINGTON US abstract	13,14,25
A	DE 22 12 854 A (WSESOJUSNYJ NAUTSCHNO) 2 November 1972 (1972-11-02) the whole document	1,21,22, 46
A	WO 97 30082 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 21 August 1997 (1997-08-21) the whole document & FR 2 745 004 A cited in the application	1,21,22
A	EP 0 307 841 A (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 22 March 1989 (1989-03-22) the whole document	17,19, 20,23, 25,26, 29,30, 35,36
A	EP 0 607 080 A (TRANSGENE SA) 20 July 1994 (1994-07-20) page 2, line 28 - line 53	17-19
A	HOFFMANN J A ET AL.: "Insect defensins: inducible antibacterial peptides" IMMUNOLOGY TODAY., vol. 13, no. 10, 1992, pages 411-415, XP002089181 CAMBRIDGE GB the whole document	1-46
P,X	LAMBERTY M ET AL.: "Insect immunity - Isolation from the lepidopteran Heliothis virescens of a novel insect defensin with potent antifungal activity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 274, no. 14, 2 April 1999 (1999-04-02), pages 9320-9326, XP002112857 BALTIMORE, US ISSN: 0021-9258 the whole document	1-25



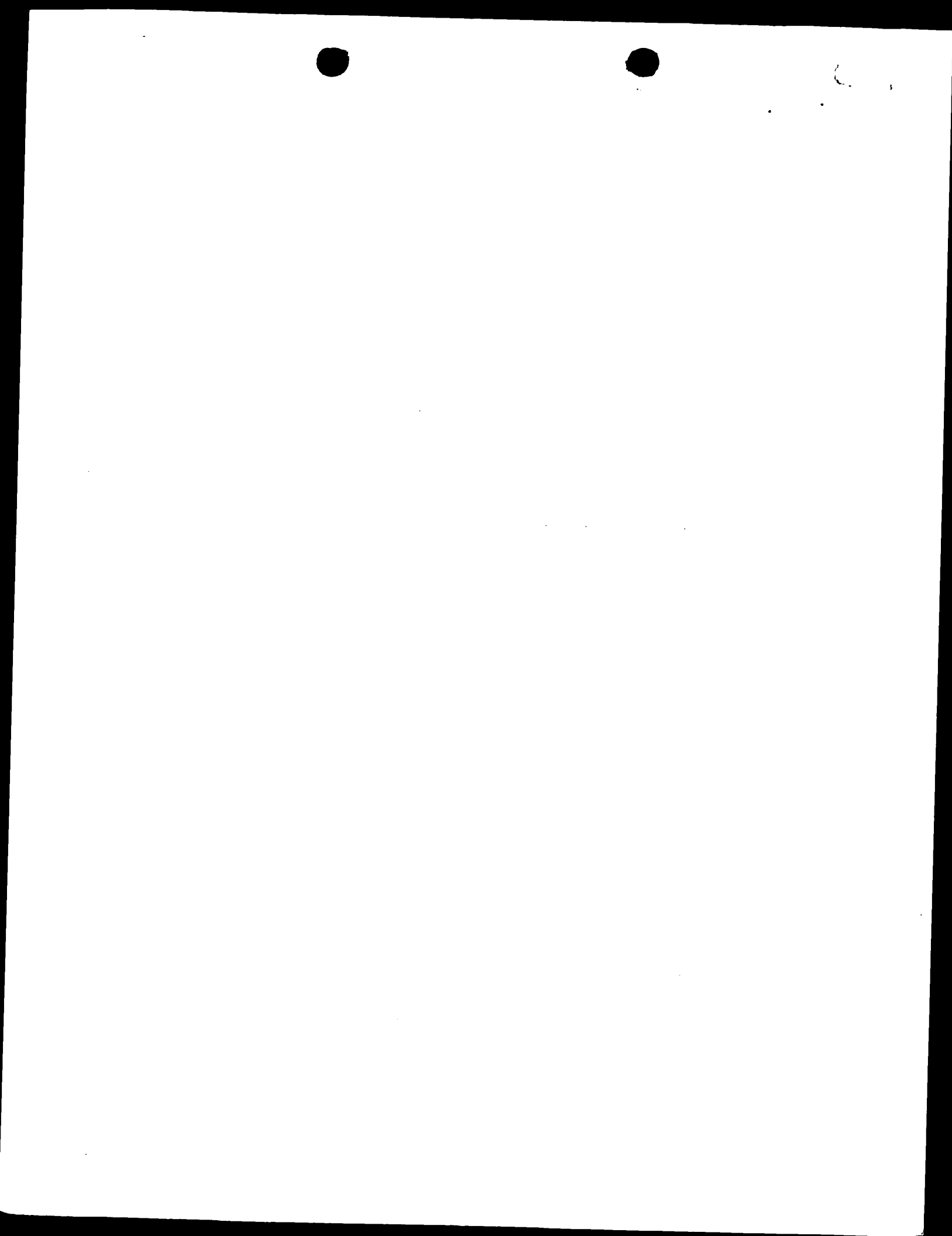
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00843

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2695392	A	11-03-1994	NONE	
WO 9011770	A	18-10-1990	CA 2030779 A EP 0425616 A	12-10-1990 08-05-1991
FR 2725992	A	26-04-1996	NONE	
DE 2212854	A	02-11-1972	CH 568387 A FR 2130267 A GB 1355163 A	31-10-1975 03-11-1972 05-06-1974
WO 9730082	A	21-08-1997	FR 2745004 A AU 1884397 A CA 2245518 A CN 1216047 A EP 0882063 A PL 328579 A	22-08-1997 02-09-1997 21-08-1997 05-05-1999 09-12-1998 01-02-1999
EP 0307841	A	22-03-1989	AU 2487788 A WO 8902437 A	17-04-1989 23-03-1989
EP 0607080	A	20-07-1994	FR 2700338 A	13-07-1994



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No

PCT/FR 99/00843

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/82 A61K38/17 C12P21/02
C12N15/62 C12N15/81

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 695 392 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11 mars 1994 (1994-03-11) page 1, ligne 33 - page 7, ligne 2	1-4, 8, 11, 21, 22, 46
Y	---	13, 14, 25
X	WO 90 11770 A (CALGENE INC) 18 octobre 1990 (1990-10-18) page 1 - page 19	1-4, 8, 11, 17, 18, 21-24, 28-46
X	FR 2 725 992 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 26 avril 1996 (1996-04-26) cité dans la demande le document en entier ---	1-4, 8, 11, 21, 22
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 août 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/09/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No
PCT/FR 99/00843

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHUNG K T ET AL: "Antibacterial factors in immune hemolymph from heliothis virescens larvae" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 96, no. 0, 19 mai 1996 (1996-05-19), page 275 XP002089180 WASHINGTON US abrégé	13,14,25
A	DE 22 12 854 A (WSESOJUSNYJ NAUTSCHNO) 2 novembre 1972 (1972-11-02) le document en entier	1,21,22, 46
A	WO 97 30082 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 21 août 1997 (1997-08-21) le document en entier & FR 2 745 004 A cité dans la demande	1,21,22
A	EP 0 307 841 A (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 22 mars 1989 (1989-03-22) le document en entier	17,19, 20,23, 25,26, 29,30, 35,36
A	EP 0 607 080 A (TRANSGENE SA) 20 juillet 1994 (1994-07-20) page 2, ligne 28 - ligne 53	17-19
A	HOFFMANN J A ET AL.: "Insect defensins: inducible antibacterial peptides" IMMUNOLOGY TODAY., vol. 13, no. 10, 1992, pages 411-415, XP002089181 CAMBRIDGE GB le document en entier	1-46
P,X	LAMBERTY M ET AL.: "Insect immunity - Isolation from the lepidopteran Heliothis virescens of a novel insect defensin with potent antifungal activity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 274, no. 14, 2 avril 1999 (1999-04-02), pages 9320-9326, XP002112857 BALTIMORE, US ISSN: 0021-9258 le document en entier	1-25

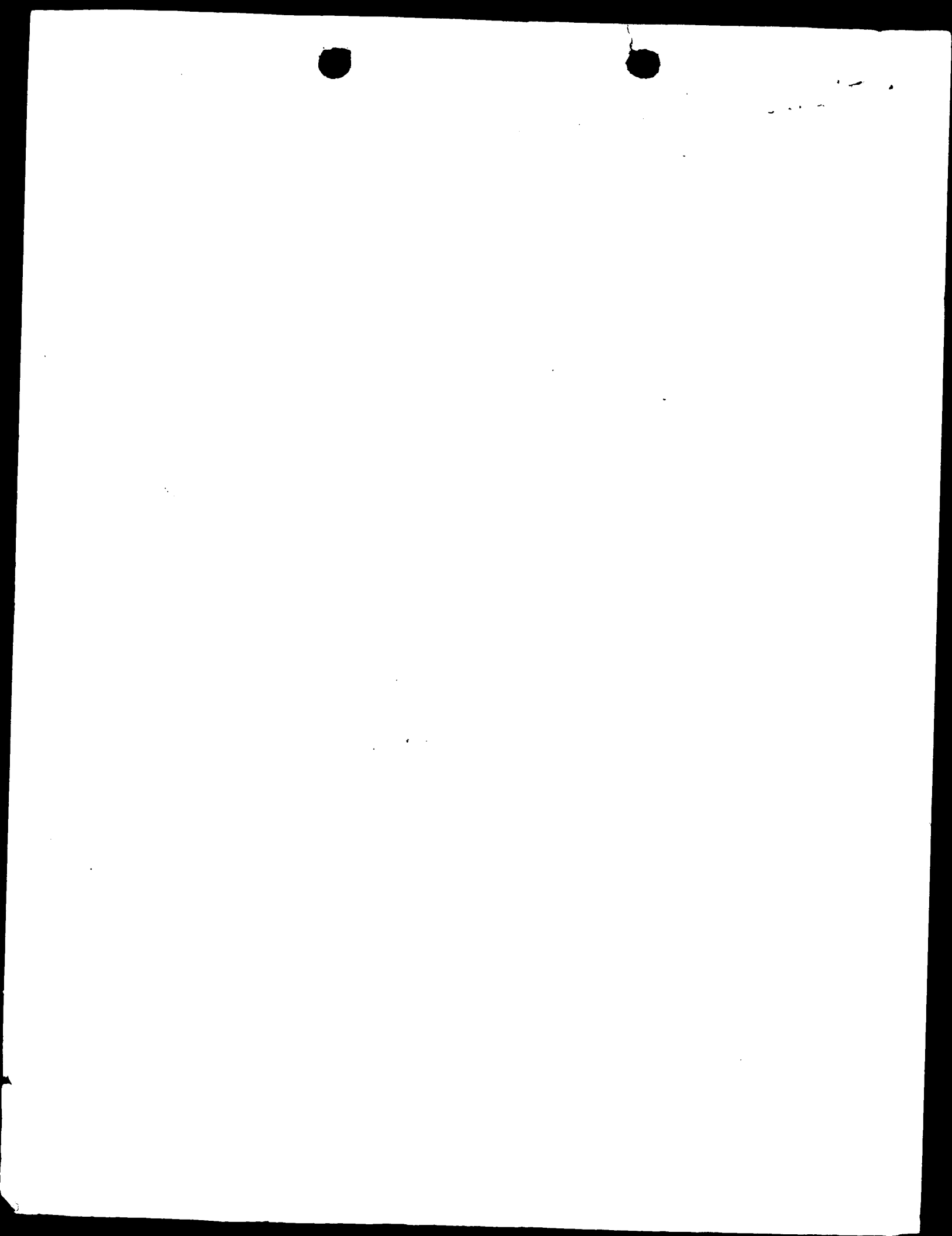
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demi Internationale No

PCT/FR 99/00843

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2695392 A	11-03-1994	AUCUN	
WO 9011770 A	18-10-1990	CA 2030779 A EP 0425616 A	12-10-1990 08-05-1991
FR 2725992 A	26-04-1996	AUCUN	
DE 2212854 A	02-11-1972	CH 568387 A FR 2130267 A GB 1355163 A	31-10-1975 03-11-1972 05-06-1974
WO 9730082 A	21-08-1997	FR 2745004 A AU 1884397 A CA 2245518 A CN 1216047 A EP 0882063 A PL 328579 A	22-08-1997 02-09-1997 21-08-1997 05-05-1999 09-12-1998 01-02-1999
EP 0307841 A	22-03-1989	AU 2487788 A WO 8902437 A	17-04-1989 23-03-1989
EP 0607080 A	20-07-1994	FR 2700338 A	13-07-1994



PATENT COOPERATION TREATY

[stamp]

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

TETAZ, F.
RHONE-POULENC AGRO
B.P. 9163
F-69263 Lyon Cedex 09
FRANCE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT



(PCT Rule 71.1)

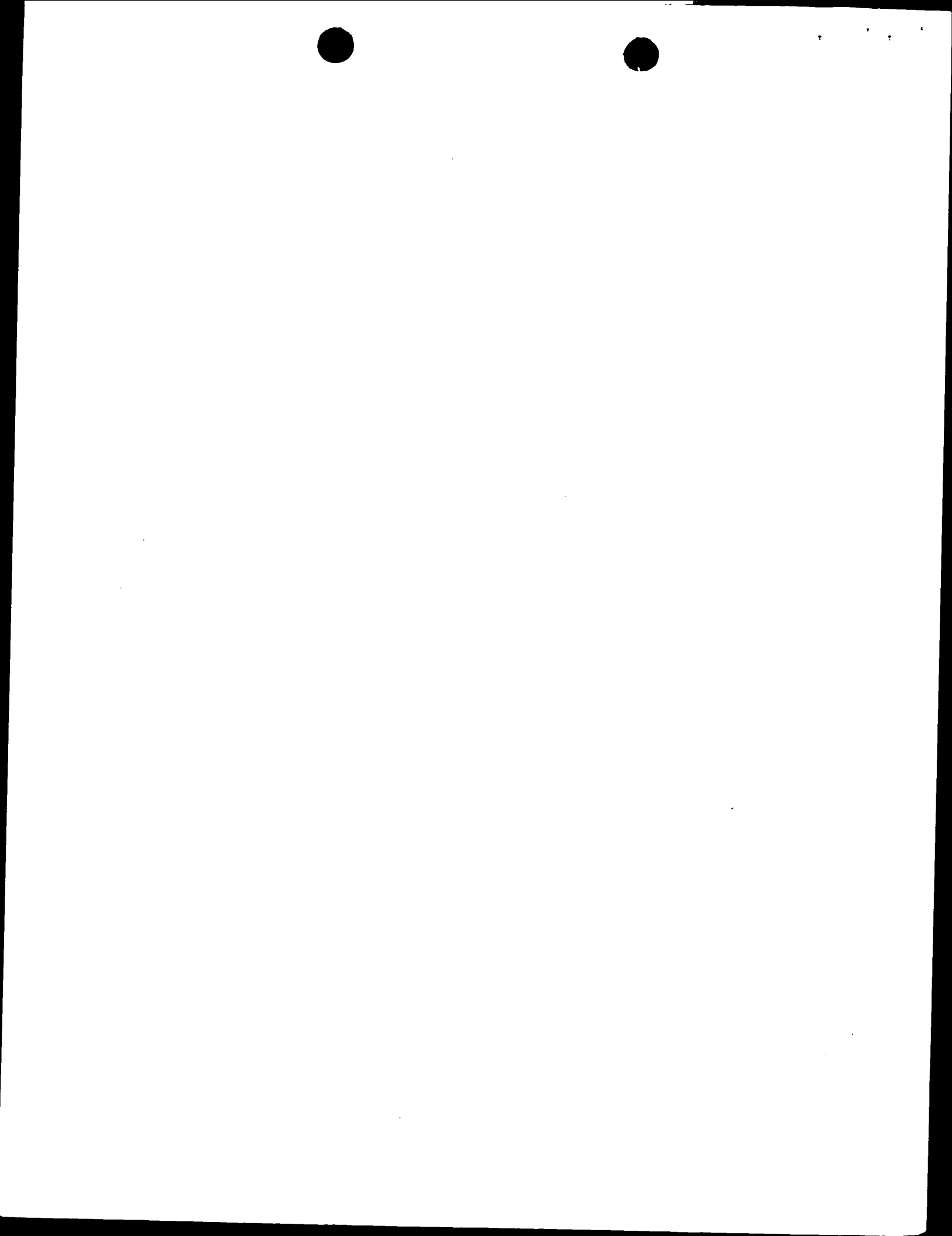
Date of mailing (day/month/year) 26.07.2000			
Applicant's or agent's file reference PH 98015	IMPORTANT NOTIFICATION		
International application No. PCT/FR99/00843	<table border="1"> <tr> <td>International filing date (day/month/year) 12/04/1999</td> <td>Priority date (day/month/year) 15/04/1998</td> </tr> </table>	International filing date (day/month/year) 12/04/1999	Priority date (day/month/year) 15/04/1998
International filing date (day/month/year) 12/04/1999	Priority date (day/month/year) 15/04/1998		
Applicant RHONE-POULENC AGRO et al.			

- The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
- A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
- Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
- REMINDER**
The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39.1) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/  <p>European Patent Office D-80298 Munich Tel. + 49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: + 49 89 2399 - 4465</p>	Authorized officer: <p>Christensen, J</p> <p>Tel. +49 89 2399-8052</p> 
--	--



PATENT COOPERATION TREATY

PCT



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

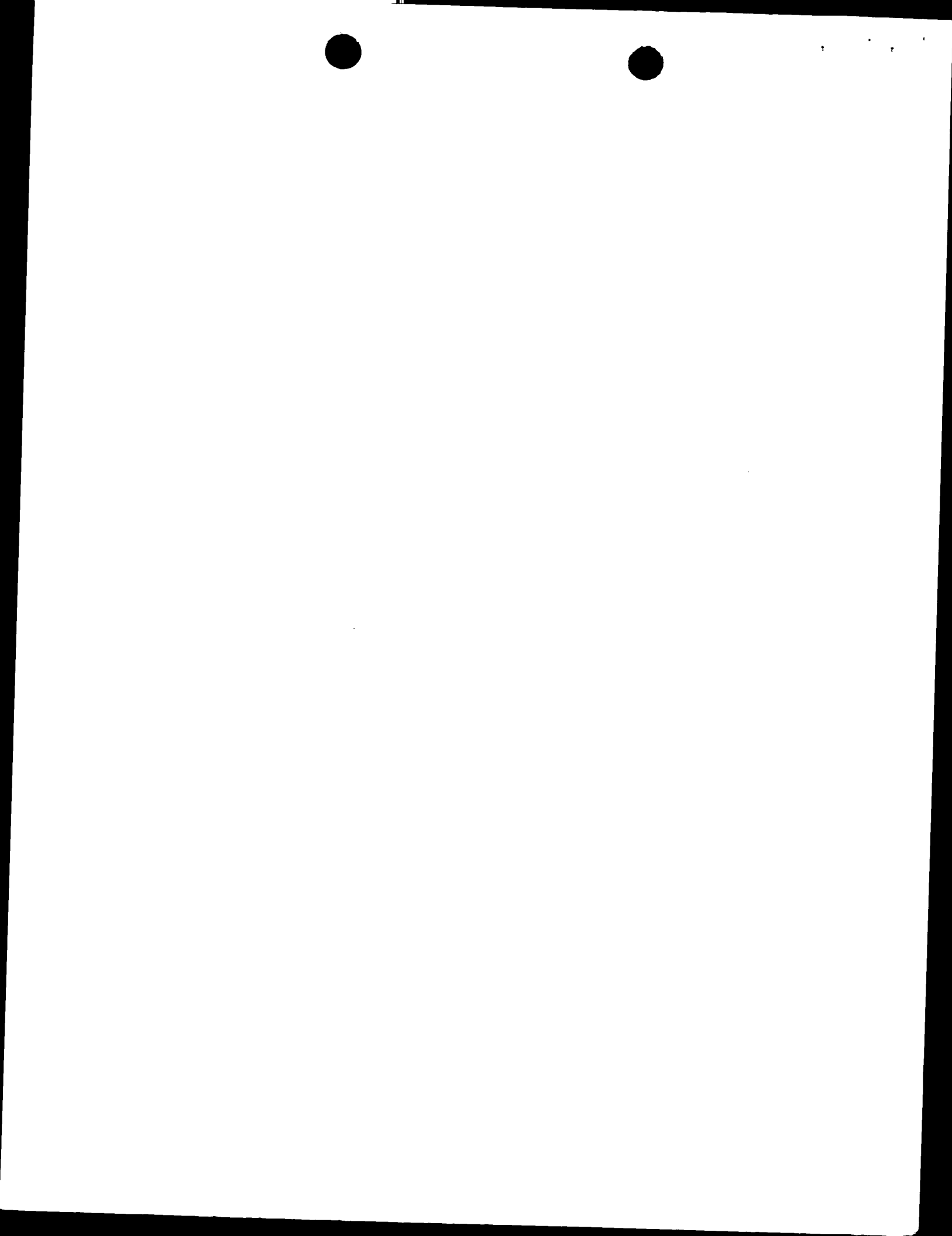
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference PH 98015	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/00843	International filing date (<i>day/month/year</i>) 12/04/1999	Priority date (<i>day/month/year</i>) 15/04/1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/12		
Applicant RHONE-POULENC AGRO et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets including this title page.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings amended during international preliminary examination and/or containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of PCT Administrative Instructions).
- These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:
- I ☒ Basis of the report
 - II ☐ Priority
 - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☒ Certain defects in the international application
 - VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10/11/1999	Date of completion of this report 26.07.2000
Name and mailing address of the IPEA/  <div style="margin-left: 20px;"> European Patent Office D-80298 Munich Tel. + 49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: + 49 89 2399 - 4465 </div>	Authorized officer: Vix, O Telephone No. +49 89 2399 7326 



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR99/00843

I. Basis of the report

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments.):*

Description, pages:

1-38 as originally filed

Claims, No.:

1-46 as originally filed

Drawings, sheets:

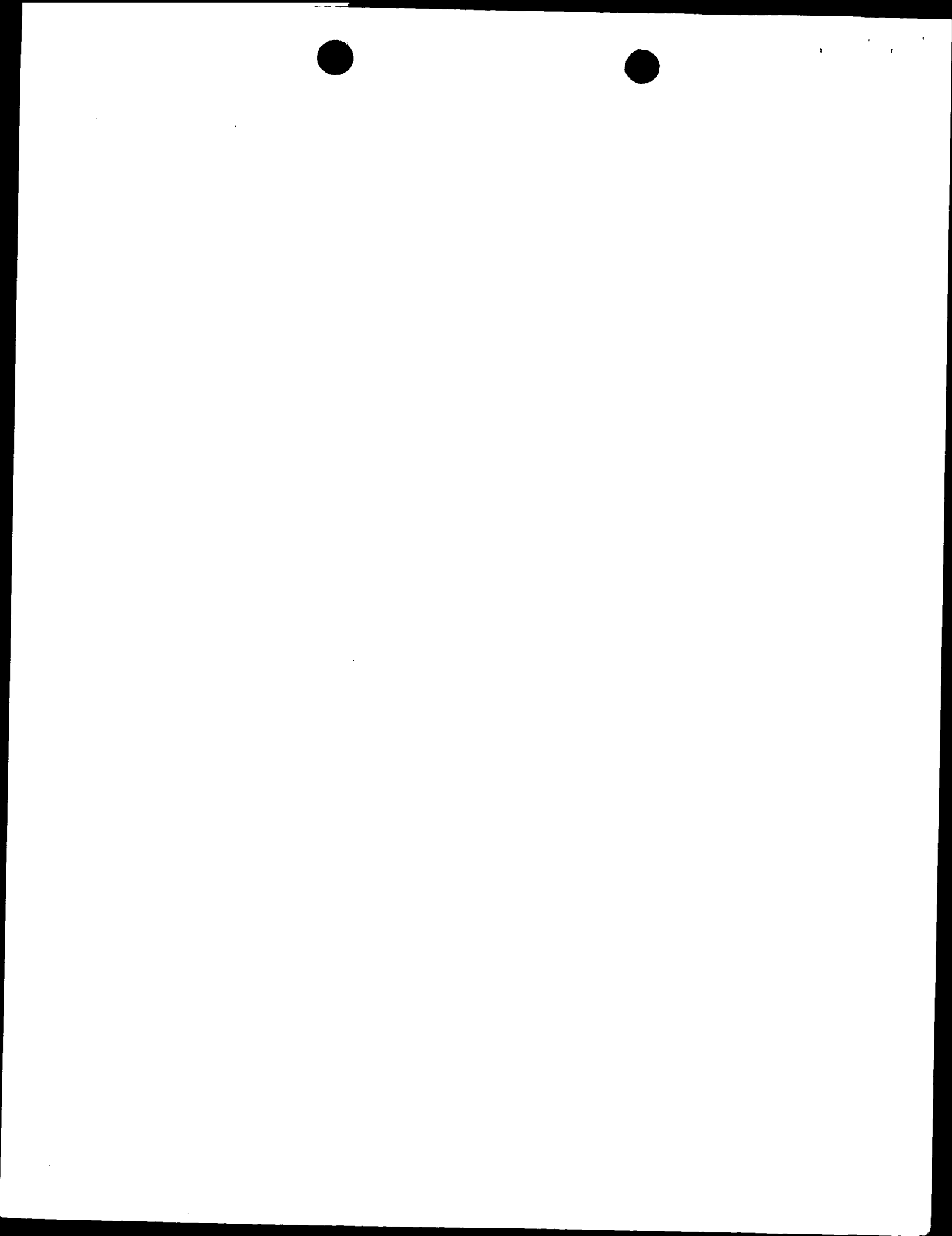
1/2-2/2 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

3. ☐ The present report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated as follows (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR99/00843

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes: Claims	1-46
	No: Claims	
Inventive Step	Yes: Claims	
	No: Claims	1-46
Industrial Applicability	Yes: Claims	1-46
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

VIII. Certain observations in the international application

The following observations on the clarity of the claims, descriptions, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet



As regards point V

Reasoned statement in accordance with Article 35(2) as regards novelty, the inventive step and the possibility of industrial application, citations and explanations in support of this statement.

1. Reference is made to the following documents:

- D1: FR-A-2 695 392 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11 March 1994 (1994-03-11)
D2: WO 90 11770 A (CALGENE INC) 18 October 1990 (1990-10-18)
D3: HOFFMANN J A ET AL.: 'Insect defensins: inducible antibacterial peptides' IMMUNOLOGY TODAY., vol. 13, No. 10, 1992, pages 411-415, XP002089181 CAMBRIDGE GB

2. The heliomicine polypeptides described in Claim 1 appear to be novel since they describe primary sequences which are different from the molecules described in documents D1-D2. Compared with the defensins mentioned in D1-D2, the molecules derived from the formula (I) comprise variations in the length of the peptide fragments situated between each of the six cysteines characteristic of the molecule.

3. The molecules of the "defensins" class are known to persons skilled in the art as revealed by documents D1 or D2. The heliomicine is a polypeptide belonging to this same family described in the prior art. This peptide was purified from the haemolymph of immunized larvae of the lepidoptera *H. virescens* and is characterized, like all the members of its family, by its primary structure rich in cysteine residues forming intrachain

disulphide bridges.

Document D1, which is considered as the closest state of the art, describes antibacterial peptides derived from the larvae of insects (e.g. *Phormia terranovae*) belonging to the defensins family.

The defensins which are the subject of Claim 1 appear to be novel because they are distinguishable from the prior art in their primary structure by the specific size of certain intercysteine peptide segments. However, their structural backbone is a constant for this class of molecules because of the existence of intrachain disulphide bridges between the cysteines (arrangement described in D3, page 413).

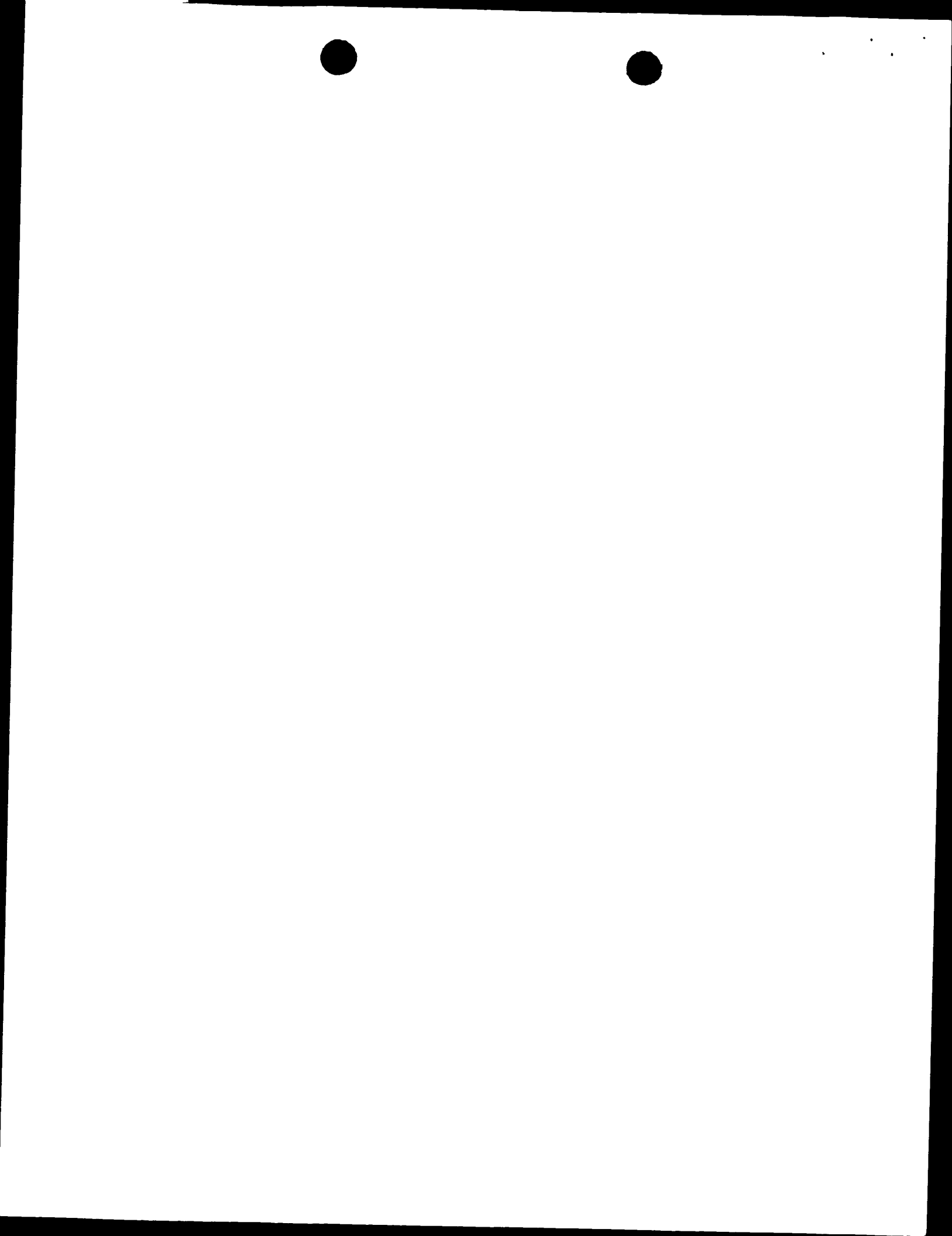
The problem which the present invention proposes to solve can therefore be considered to be the production of alternatives of molecules of insect defensins having antimicrobial properties.

The solution proposed in Claims 1-46 of the present application is not considered to be inventive (Article 33(3) PCT) for the following reasons:

The antifungal and antibacterial properties of the defensins were known in the prior art, as demonstrated by document D2 (page 13, lines 21-26 and Tables 1 and 2 page 22-23).

To provide a solution to the technical problem posed, persons skilled in the art would be led in an obvious manner to use the information provided by document D1. Indeed, persons skilled in the art would be led to choose various insect larvae in order to immunize them against known pathogens, this being with the aim of purifying novel defensins from the haemolymph recovered.

Furthermore, by virtue of the alignment of the

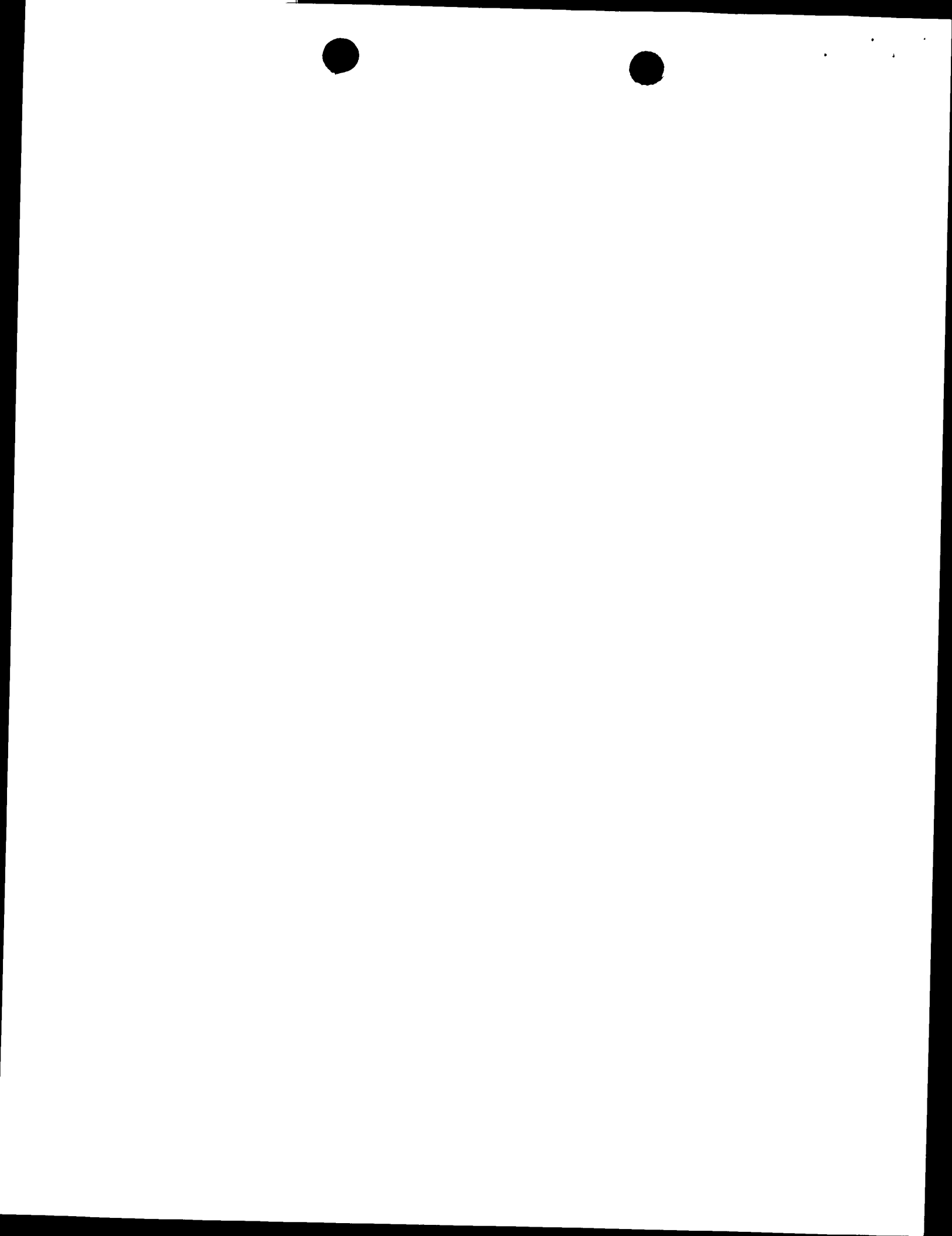


primary sequences of various members within the defensins class (see example in Figure 1 D3, page 412), it is clear for a person skilled in the art that the structural constant imposed by the disulphide bridges is important for the biological activity of defensins. Such an alignment also shows that there is a possible variation of the size of the fragments between each cysteine. There is unavoidably derived therefrom a "consensus" formula of the formula (I) type in which the size of the peptide fragments situated between each of the six cysteines characteristic of the molecule is not fixed in a rigid manner. Accordingly, the search for fragments of variable length between each cysteine residue (example: X_{ab} , X_{ac} , X_{ad} , ...) involves an approach which is obvious for persons skilled in the art wishing to obtain novel active variants.

Consequently, in the absence of any novel unexpected technical effect (these variants all possess the same antimicrobial activities known in the prior art), the production and the purification of novel defensins of insect larvae does not involve an inventive step within the meaning of Article 33(3) PCT.

The production of fusion peptides, the use of the biological properties of the peptides as well as the methods of transforming plant cells or of producing heliomicine are current practice for persons skilled in the art and do not involve an inventive step.

Accordingly, Claims 1-46 are not considered to have an inventive step within the meaning of Article 33(3) PCT.



As regards point VII

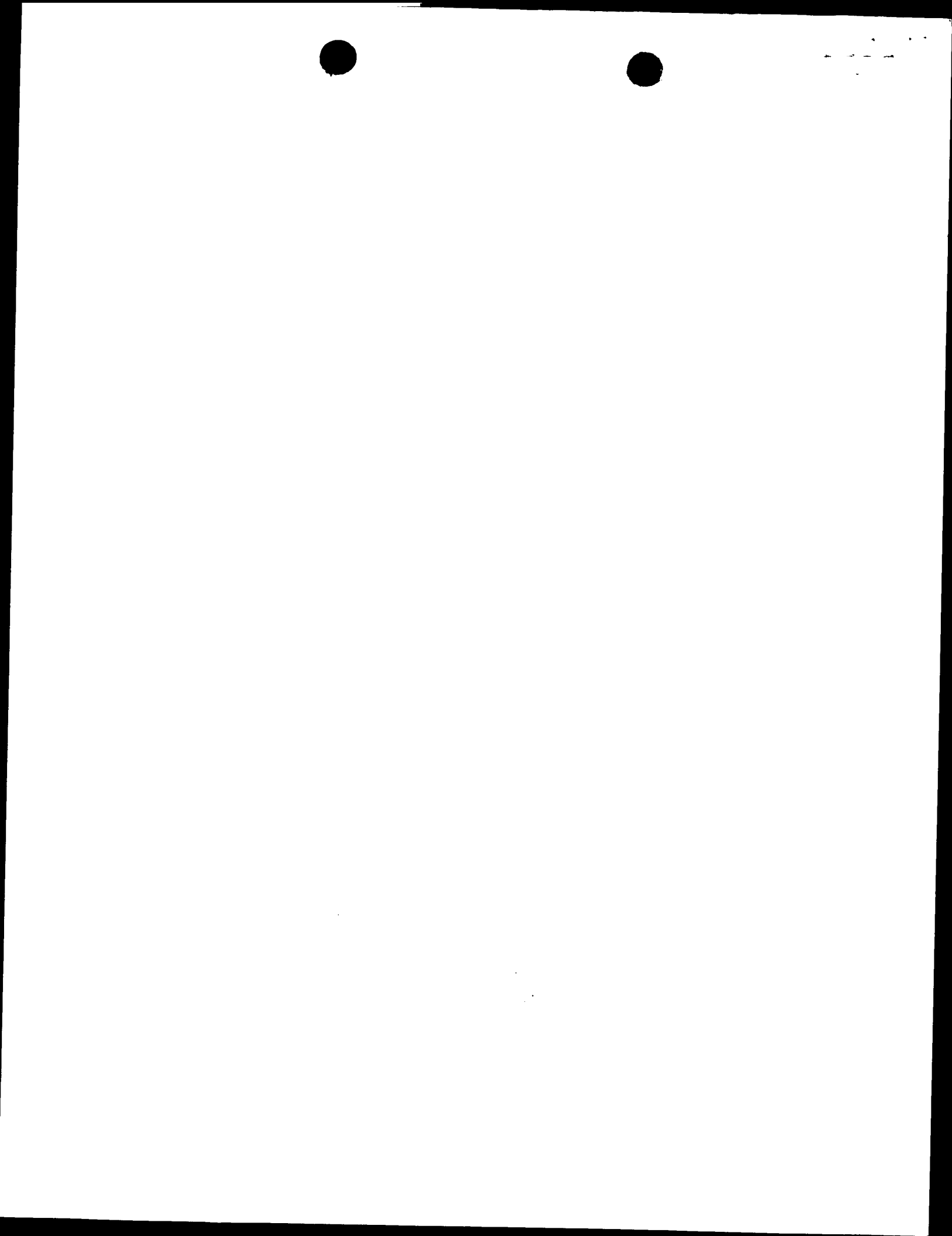
Irregularities in the international application

Contrary to what is required by rule 5.1 a) ii) PCT, the description does not indicate the relevant prior state of the art disclosed in documents D1 and D2.

As regards point VIII

Observations relating to the international application

1. In Claims 10 and 44, the references to the earlier claims appear to be erroneous. Thus, Claim 10 refers to itself and Claim 44 refers to a method according to Claim 33 which is a host organism (it must correspond to the method of Claim 43).
2. The formulation "fusion peptide" of Claim 17 is vague and is open to interpretation. The peptide in question could be characterized by unambiguous technical information.
3. Furthermore, it should be noted that practically all the variants claimed by formula (I) in Claim 1 were not synthesized, or tested in the description to demonstrate their antimicrobial activity.



- éthylène glycol	50 g
- huile organopolysiloxanique (antimousse)	1 g
- polysaccharide	1,5 g
- eau	316,5 g

5

Les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser) sont habituellement préparées de manière qu'elles contiennent 20 à 95 % de matière active, et elles contiennent habituellement, en plus du support solide, de 0 à 30 % d'un agent mouillant, de 3 à 20 % d'un agent dispersant, et, quand c'est nécessaire, de 0,1 à 10 % d'un ou plusieurs stabilisants et/ou autres additifs, comme des agents de pénétration, des adhésifs, ou des agents antimottants, colorants, etc...

Pour obtenir les poudres à pulvériser ou poudres mouillables, on mélange intimement les matières actives dans les mélangeurs appropriés avec les substances additionnelles et on broie avec des moulins ou autres broyeurs appropriés. On obtient par là des poudres à pulvériser dont la mouillabilité et la mise en suspension sont avantageuses ; on peut les mettre en suspension avec de l'eau à toute concentration désirée et ces suspensions sont utilisables très avantageusement en particulier pour l'application sur les feuilles des végétaux.

A la place des poudres mouillables, on peut réaliser des pâtes. Les conditions et modalités de réalisation et d'utilisation de ces pâtes sont semblables à celles des poudres mouillables ou poudres à pulvériser.

A titre d'exemple, voici diverses compositions de poudres mouillables (ou poudres à pulvériser) :

25

Exemple PM 1

- matière active	50%
- alcool gras éthoxylé (agent mouillant)	2,5%
- phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant)	5%
- craie (support inerte)	42,5%

30

Exemple PM 2 :

- matière active	10%
- alcool synthétique oxo de type ramifié, en C13 éthoxylé par 8 à 10 oxyde d'éthylène (agent mouillant)	0,75%
- lignosulfonate de calcium neutre (agent dispersant)	12%
- carbonate de calcium (charge inerte)	q.s.p. 100 %

35



d'excellents résultats avec l'urée. Dans le cas d'une charge insoluble, celle-ci est de préférence minérale, comme par exemple le kaolin ou la bentonite. Elle est alors avantageusement accompagnée d'agents tensio-actifs (à raison de 2 à 20 % en poids du granulé) dont plus de la moitié est, par exemple, constituée par au moins un agent dispersant, essentiellement anionique, tel qu'un polynaphtalène sulfonate alcalin ou alcalino terreux ou un lignosulfonate alcalin ou alcalino-terreux, le reste étant constitué par des mouillants non ioniques ou anioniques tel qu'un alcoyl naphtalène sulfonate alcalin ou alcalino-terreux.

Par ailleurs, bien que cela ne soit pas indispensable, on peut ajouter d'autres adjuvants tels que des agents anti-mousse.

Le granulé selon l'invention peut être préparé par mélange des ingrédients nécessaires puis granulation selon plusieurs techniques en soi connues (drageoir, lit fluide, atomiseur, extrusion, etc...). On termine généralement par un concassage suivi d'un tamisage à la dimension de particule choisie dans les limites mentionnées ci-dessus. On peut encore utiliser des granules obtenus comme précédemment puis imprégnés avec une composition contenant la matière active.

De préférence, il est obtenu par extrusion, en opérant comme indiqué dans les exemples ci-après.

20 Exemple GD1 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange 90 % en poids de matière active et 10 % d'urée en perles. Le mélange est ensuite broyé dans un broyeur à broches. On obtient une poudre que l'on humidifie avec environ 8 % en poids d'eau. La poudre humide est extrudée dans une extrudeuse à rouleau perforé. On obtient un granulé qui est séché, puis concassé et tamisé, de façon à ne garder respectivement que les granules d'une dimension comprise entre 150 et 2000 microns.

Exemple GD2 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange les constituants suivants :

30	- matière active	75%
	- agent mouillant (alkylnaphtalène sulfonate de sodium)	2%
	- agent dispersant (polynaphtalène sulfonate de sodium)	8%
	- charge inerte insoluble dans l'eau (kaolin)	15%

35 Ce mélange est granulé en lit fluide, en présence d'eau, puis séché, concassé et tamisé de manière à obtenir des granules de dimension comprise entre 0,15 et 0,80 mm.

Ces granules peuvent être utilisés seuls, en solution ou dispersion dans de l'eau de manière à obtenir la dose cherchée. Ils peuvent aussi être utilisés pour préparer des



associations avec d'autres matières actives, notamment antibactériens, ces dernières étant sous la forme de poudres mouillables, ou de granulés ou suspensions aqueuses.

En ce qui concerne les compositions adaptées au stockage et au transport, elles contiennent plus avantageusement de 0,5 à 95 % (en poids) de substance active.

5

L'invention concerne également un procédé pour le traitement antibactérien thérapeutique pour l'homme ou l'animal par administration d'une dose efficace du peptide selon l'invention, sous forme libre ou, le cas échéant, sous forme de sels d'addition avec un acide, de sels Andalliques ou de sels d'addition avec une base pharmaceutiquement acceptables, à l'état pur ou sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les médicaments selon l'invention peuvent être administrés par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

10

Comme compositions solides pour administration orale peuvent être utilisés des comprimés, pilules, poudres (notamment dans des capsules de gélatine ou des cachets) ou granulés. Dans ces compositions, le produit actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tel que le stéarate de magnésium ou la talc, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

15

20

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops, et des élixirs pharmaceutiquement acceptable contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants..

25

Les compositions stériles pour administration parentérale peuvent être de préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylèneglycol, un polyéthylène glycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de différentes façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent être également préparées sous forme de compositions solides stériles, qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans un milieu stérile injectable.

30

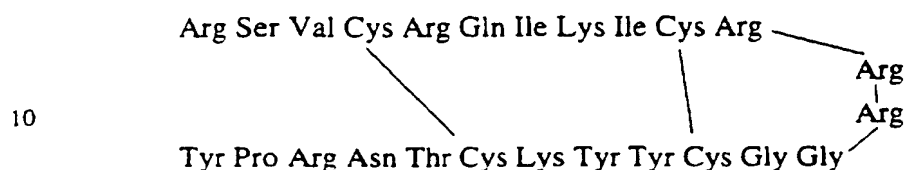
35



REVENDICATIONS

5

1. Peptide de formule:



2. Composition antibactérienne, caractérisée en ce qu'elle contient comme matière active un peptide selon la revendication 1.

15

3. Composition selon la revendication 2, utilisable pour la protection des plantes contre les bactéries pathogènes.

20

4. Composition selon la revendication 2, utilisable pour le traitement thérapeutique du corps humain ou animal.

5. Composition antifongique, caractérisée en ce qu'elle contient comme matière active un peptide selon la revendication 1.

25

6. Composition selon la revendication 5, utilisable pour la protection des plantes contre les bactéries pathogènes.

7. Composition selon la revendication 5, utilisable pour le traitement thérapeutique du corps humain ou animal.

30

8. Procédé pour la protection des plantes contre les maladies bactériennes, caractérisé en ce qu'on applique, comme matière active, un peptide selon la revendication 1.

35

9. Procédé pour la protection des plantes contre les maladies fongiques, caractérisé en ce qu'on applique, comme matière active, un peptide selon la revendication 1.

10. Procédé de préparation du peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que, successivement:



- a) on prélève de l'hémolymphe du scorpion *Androctonus australis* ;
b) on effectue l'extraction par mise en contact d'hémolymphe ou d'un broyat de
Androctonus australis obtenues précédemment avec un milieu acide à neutre
sous agitation, puis par centrifugation;
c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules
hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés,
sur colonne séparatrice;
d) on purifie les extraits;
e) on effectue le séquençage.

5

10



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

REÇU D.P.I.

3 1 JUIL. 2000

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

→ *H7*
ur

PCT

Destinataire:

TETAZ, F.
RHONE-POULENC AGRO
B.P. 9163
F-69263 Lyon Cedex 09
FRANCE

**NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL**
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 26.07.2000

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
PH 98015

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR99/00843

Date du dépôt international (jour/mois/année)
12/04/1999

Date de priorité (jour/mois/année)
15/04/1998

Déposant
RHONE-POULENC AGRO et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international

Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Christensen, J

Tél. +49 89 2399-8052





TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98015	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/00843	Date du dépôt international (jour/mois/année) 12/04/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 15/04/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/12		
Déposant RHONE-POULENC AGRO et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 10/11/1999	Date d'achèvement du présent rapport 26.07.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Vix, O N° de téléphone +49 89 2399 7326 



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00843

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-38 version initiale

Revendications, N°:

1-46 version initiale

Dessins, feuilles:

1/2-2/2 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00843

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-46
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-46
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-46
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence aux documents suivants:

D1: FR-A-2 695 392 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE)
11 mars 1994 (1994-03-11)

D2: WO 90 11770 A (CALGENE INC) 18 octobre 1990 (1990-10-18)

D3: HOFFMANN J A ET AL.: 'Insect defensins: inducible antibacterial peptides'
IMMUNOLOGY TODAY., vol. 13, no. 10, 1992, pages 411-415, XP002089181
CAMBRIDGE GB

2. Les polypeptides d'héliomicine décrits dans la revendication 1 apparaissent nouveaux dans la mesure où ils décrivent des séquences primaires distinctes des molécules décrites dans les documents D1-D2. Par rapport aux défensines mentionnées en D1-D2, les molécules dérivées de la formule (I) comporte des variations dans la longueur des fragments peptidiques situés entre chacune des six cystéines caractéristiques de la molécule.

3. Les molécules de la classe des "défensines" sont connues par l'homme de métier comme le révèle les documents D1 ou D2. L'héliomicine est un polypeptide appartenant à cette même famille décrite dans l'art antérieur. Ce peptide a été purifié à partir de l'hémolymphe de larves immunisées du lépidoptère *H. virescens* et se caractérise, comme tous les membres de sa famille, par sa structure primaire riche en résidus cystéine formant des ponts disulfure intra-chaîne.

Le document D1, qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit des peptides antibactérien dérivés de larves d'insectes (e.g. *Phormia terranova*) appartenant à la famille des défensines.

Les défensines qui font l'objet de la revendication 1 apparaissent nouvelles car elles se distinguent de l'art antérieur dans leur structure primaire par la taille spécifique de certains segments peptidiques inter-cystéines. Néanmoins, leur squelette structural est une constante pour cette classe de molécules du fait de l'existence des ponts disulfure intra-chaîne entre les cystéines (arrangement décrit en D3, page 413).



Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme étant l'obtention d'alternatives de molécules de défensines d'insectes ayant des propriétés antimicrobienne.

La solution proposée dans les revendication 1-46 de la présente demande n'est pas considérée comme inventive (article 33(3) PCT) pour les raisons suivantes:

Les propriétés antifongique et antibactérienne des défensines étaient connues dans l'art antérieur, comme en atteste le document D2 (page 13, lignes 21-26 et tableaux 1 et 2 page 22-23).

Pour apporter une solution au problème technique posé, l'homme de métier serait amené d'une manière évidente à utiliser les informations fournies par le document D1. En effet, l'homme de métier serait amené à choisir différentes larves d'insectes pour les immuniser contre des pathogènes connus, ceci dans le but de purifier de nouvelles défensines à partir de l'hémolymphe recueillie.

De plus, grâce à alignement des séquences primaires de différents membres au sein de la classe des défensines (voir exemple en Fig 1 D3, page 412), il est clair pour l'homme de métier que la constante structurale imposée par les ponts disulfure est importante pour l'activité biologique des défensines. Un tel alignement montre également qu'il existe une variation possible pour la taille des fragments entre chaque cystéine. Il en dérive inévitablement une formule "consensus" du type de la formule (I) dans laquelle la taille des fragments peptidiques situés entre chacune des six cystéines caractéristiques de la molécule n'est pas fixée d'une manière rigide. C'est pourquoi la recherche de fragments de longueur variable entre chaque résidu cystéine (exemple: X_{ab} , X_{ac} , X_{ad} , ...) relève d'une démarche évidente pour l'homme de métier désireux d'obtenir de nouveaux variants actifs.

Par conséquent, en absence de tout nouvel effet technique inattendu (ces variants possèdent tous les mêmes activités antimicrobienne connues dans l'art antérieur), l'obtention et la purification de nouvelles défensines de larves d'insecte n'implique pas une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT.

L'obtention de peptides de fusion, l'utilisation des propriétés biologique des peptides ainsi que les procédés de transformation de cellules de plantes ou de production d'héliomicine relève de la pratique courante de l'homme de métier et ne présente pas

d'activité inventive.

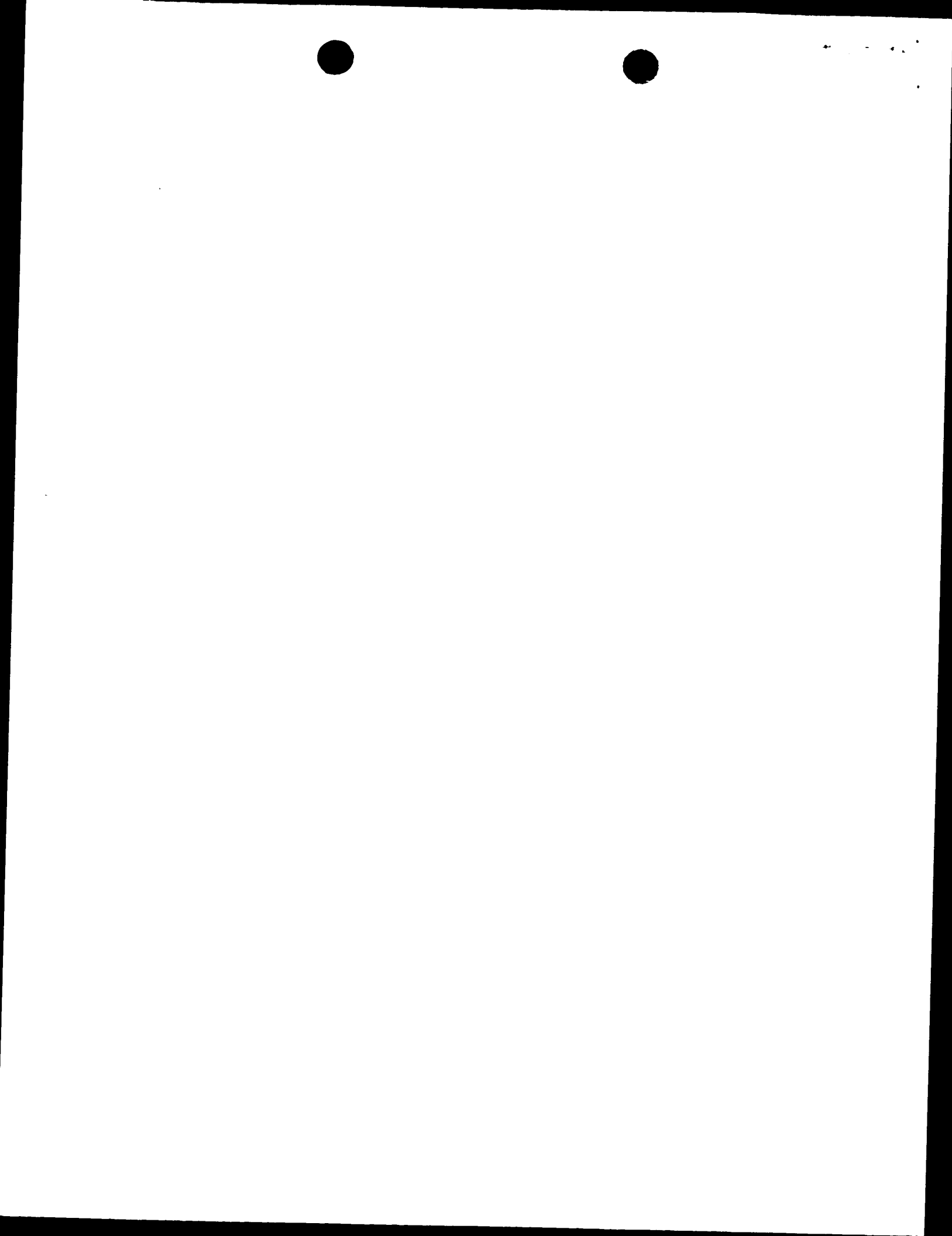
C'est pourquoi les revendications 1-46 ne sont pas considérées comme présentant une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT.

Concernant le point VII**Irrégularités dans la demande internationale**

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1 et D2.

Concernant le point VIII**Observations relatives à la demande internationale**

1. Dans les revendications 10 et 44 les références aux revendications antérieures semble erronées. Ainsi la revendication 10 se réfère à elle même et la revendication 44 se réfère à un procédé selon la revendication 33 qui est un organisme hôte (il doit s'agir du procédé de la revendication 43).
2. La formulation "peptide de fusion" de la revendication 17 est vague et ouverte à interprétation. Le peptide en question pourrait être caractérisé par des éléments techniques non ambigus.
3. De plus, il est à remarquer que la quasi-totalité des variants revendiqués par la formule (I) dans la revendication 1 n'ont pas été synthétisés, ni testés dans la description pour attester de leur activité anti-microbienne.





REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

PCT/FR 99/00843

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum)

PH 98015

Box No. I TITLE OF INVENTION

GENE ENCODING HELIOMICINE, PROTEIN OBTAINED, VECTOR CONTAINING IT,
TRANSFORMED ORGANISMS OBTAINED AND METHOD OF PREPARATION

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

RHONE-POULENC AGRO
14-20, rue Pierre Baizet
69009 LYON

☐ This person is also inventor.

Telephone No.
33 4 72 85 25 92

Facsimile No.
33 4 72 85 28 43

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:
FRANCE

State (that is, country) of residence:
FRANCE

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☒ all designated States except
the United States of America

☐ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LAMBERTY Mireille
30, rue Benfeld
67100 STRASBOURG

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☐ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf
of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☐ agent

☒ common representative

Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country)

RHONE-POULENC AGRO
BP 9163
69263 LYON CEDEX 09 FRANCE

Telephone No.
33 4 72 85 25 92

Facsimile No.
33 4 72 85 28 43

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

BULET Philippe
11, rue du Cottage
67550 - VENDENHEIM

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
FRANCE

State (that is, country) of residence:
FRANCE

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

BROOKHART Gary Lee
4903 Victoria Drive
DURHAM
NC 27713

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
USA

State (that is, country) of residence:
USA

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

HOFMANN Jules
5, rue Closener
67000 STRASBOURG

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
FRANCE

State (that is, country) of residence:
FRANCE

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

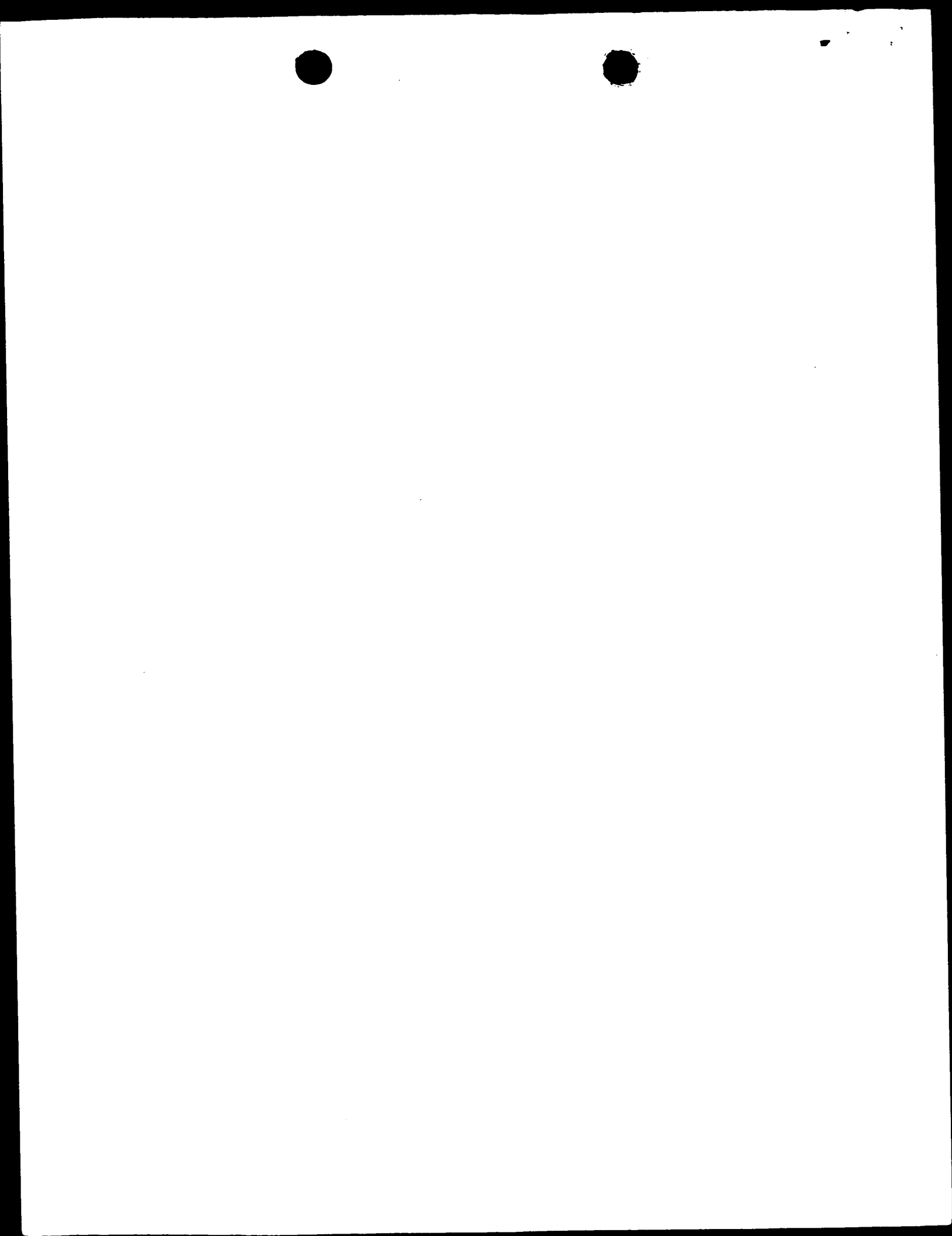
State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.



Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes, at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

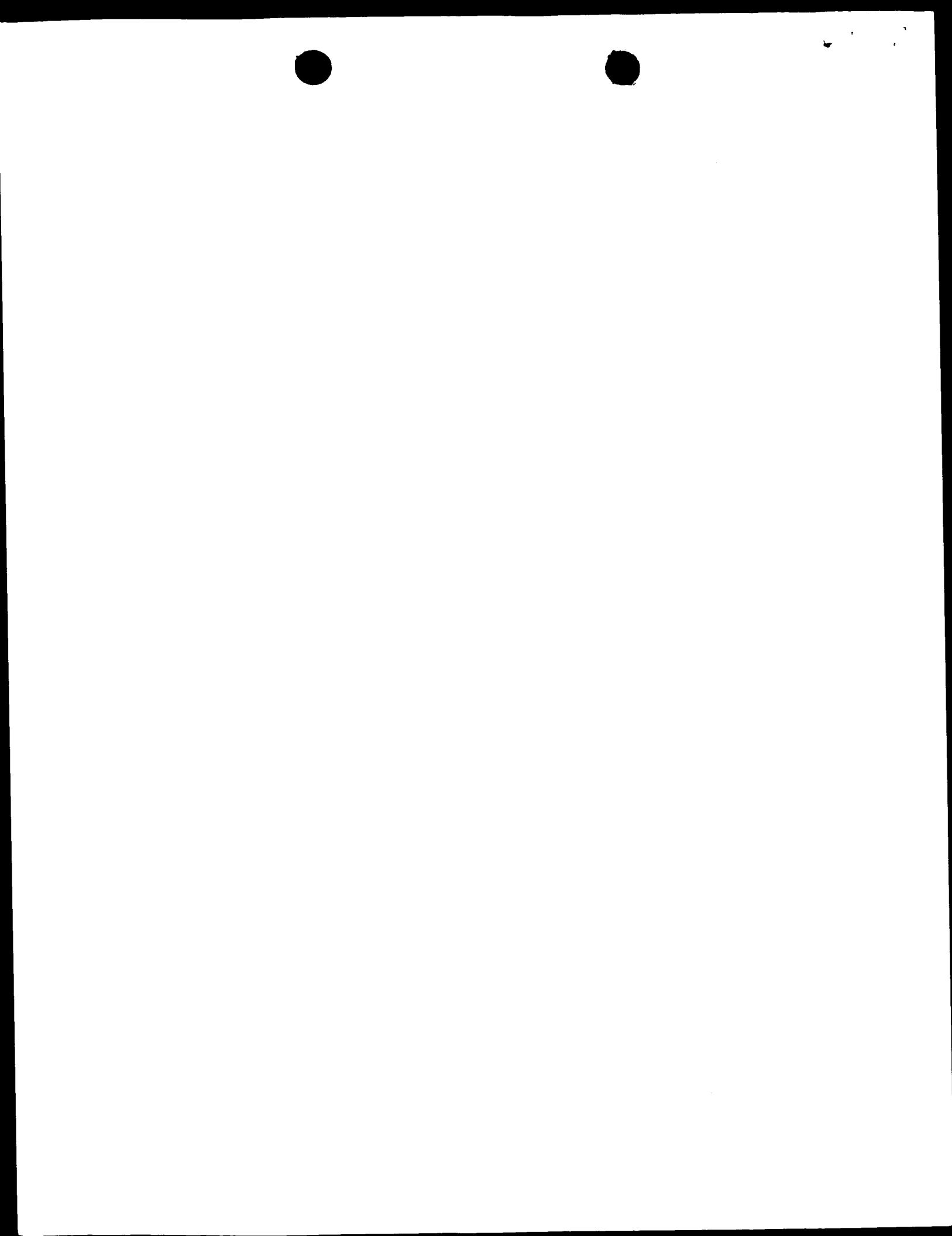
- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

☒ ZA South Africa



Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)



Box No. VI PRIORITY CLAIM					<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box				
Filing date of earlier application (day/month/year)		Number of earlier application	Where earlier application is:						
			national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office				
item (1) 15.04.98		98/04,933	FRANCE						
item (2)									
item (3)									
<input type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s):									
<small>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(iii)). See Supplemental Box</small>									
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY									
Choice of International Searching Authority (ISA) <small>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen, the two-letter code may be used:)</small>			Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the international Searching Authority)						
ISA /			Date (day/month/year) 19.01.99 Number FA 558622 Country (or regional Office) FRANCE						
Box No. VIII CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING									
This international application contains the following number of sheets: request : 4 description (excluding sequence listing part) : 38 claims : 5 abstract : 1 drawings : 2 sequence listing part of description : 15 Total number of sheets : 65			This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input checked="" type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input checked="" type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input checked="" type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): SEARCH REPORT						
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1 and 2			Language of filing of the international application: FRENCH						
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT									
<small>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</small>									
RHONE POULENC AGRO (signature) Patrick GENIN									

For receiving Office use only			
1. Date of actual receipt of the purported international application: (illegible) 12 APR. 1999		2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:			
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):			
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /		6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	
Form PCT/RO/101 (last sheet) (July 1998)	See Notes to the request form



Aventis CropScience



09/673,274

PATENT APPLICATION / DEMANDE DE BREVET

International Application N° / *Demande Internationale N°:*

PCT/FR 99/00843

Filing Date (day/month/year) / *Date du dépôt (jour/mois/année)^o:*

12/04/99

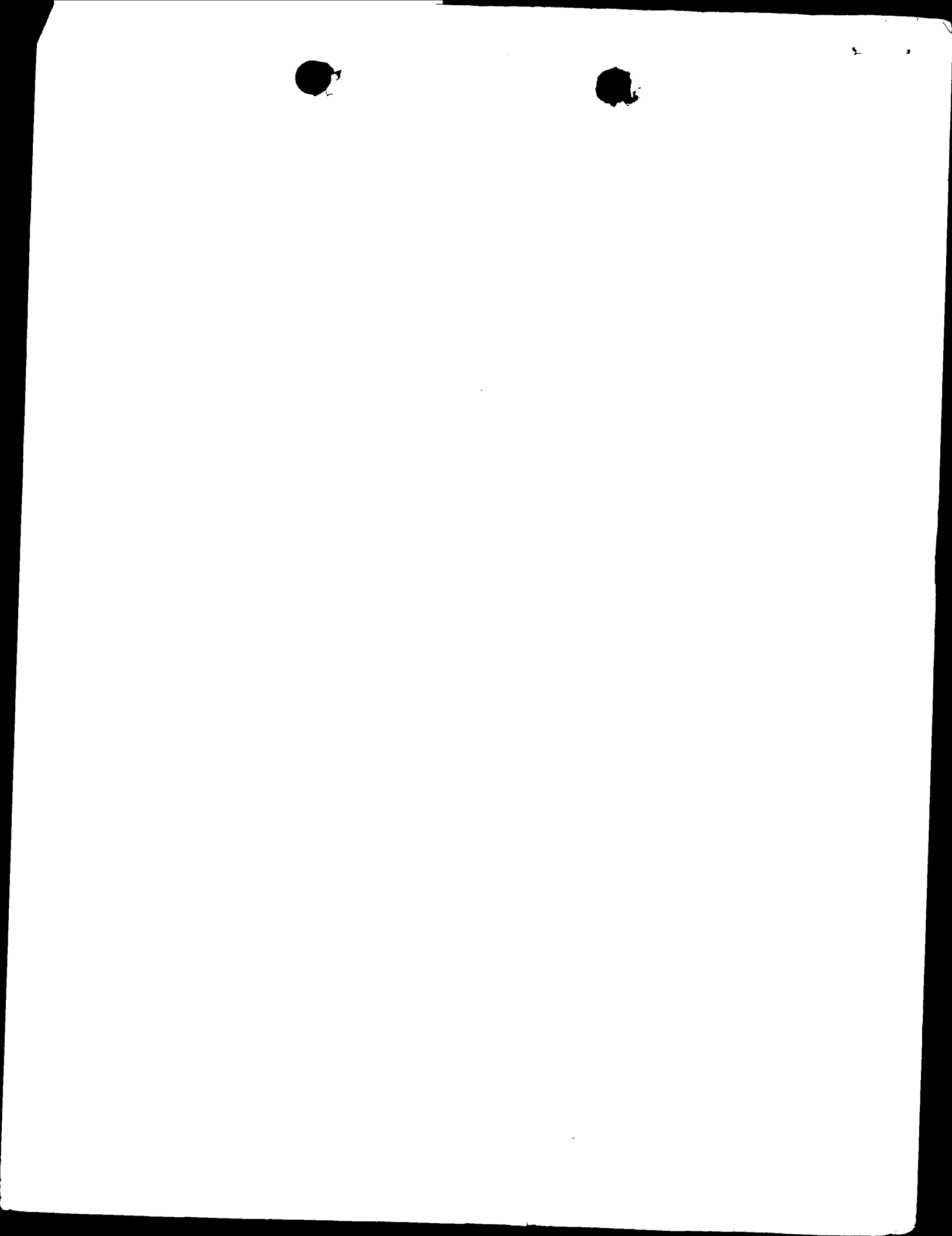
Title / Titre :

Gène codant pour l'héliomicine, protéine obtenue,
vecteur le contenant, organismes transformés
obtenus et procédé de préparation

File Ref. / Réf. Dossier : PH 98015

Aventis CropScience SA - 14/20 Rue Pierre Baizet BP 9163 F-69263 Lyon Cedex 09 - www.aventis.com
Téléphone : +33 (0) 4 72.85.27.47 - Fax : +33 (0) 4 72.85.28.43 - E. Mail : genevieve.rolin@aventis.com

Aventis CropScience Société Anonyme au capital de 2 144 727 300 F
Siège Social : 55, avenue René Cassin CP 106 F-69266 LYON Cedex 09 - RC LYON B 969 503 309



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 98015	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 00843	Date du dépôt international(jour/mois/année) 12/04/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 15/04/1998
Déposant RHONE-POULENC AGRO et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.
2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

- ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

GENE CODANT POUR L'HELIOMICINE ET SON UTILISATION

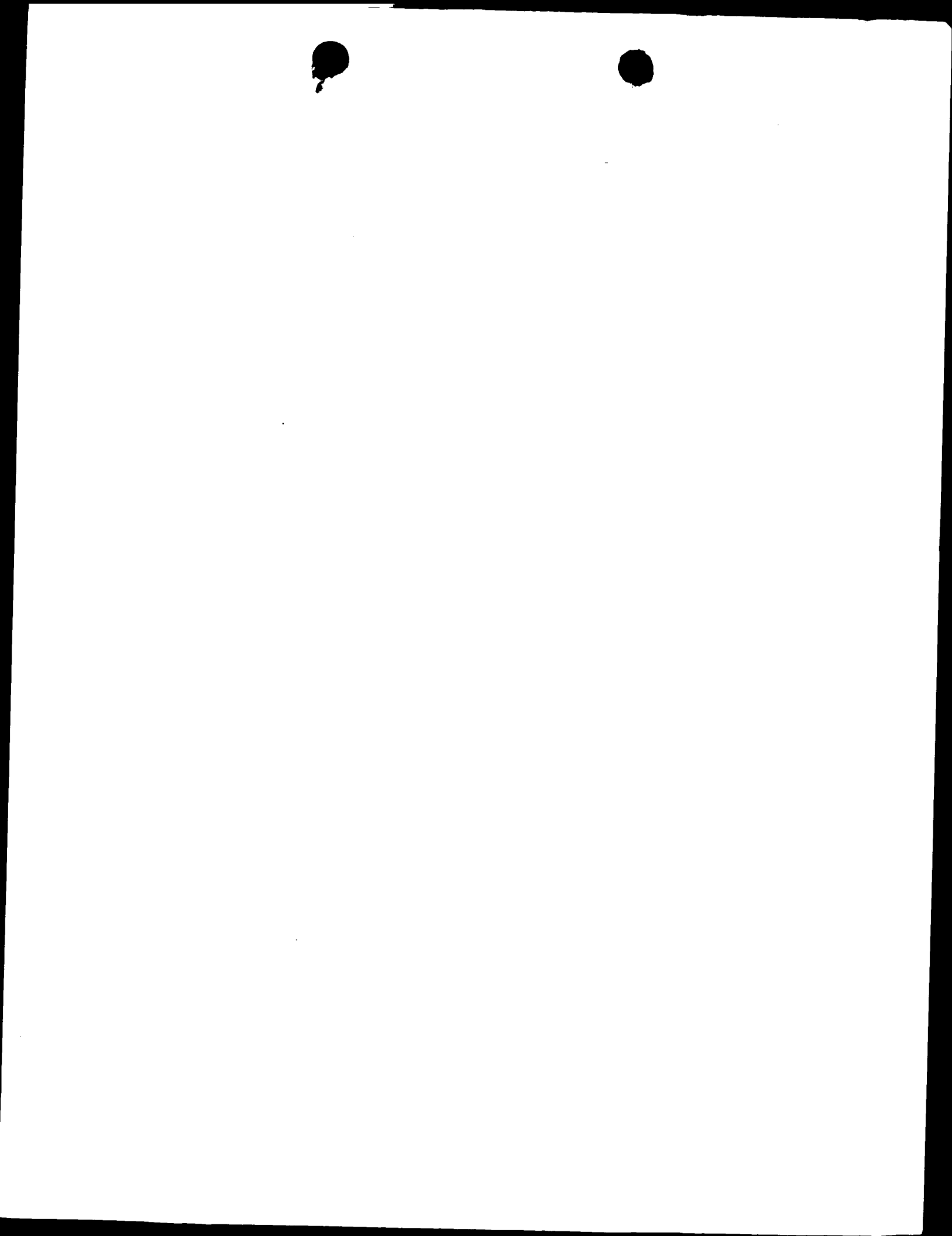
5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des **dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document Internationale No
FR 99/00843

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/82 A61K38/17 C12P21/02
C12N15/62 C12N15/81

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 695 392 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11 mars 1994 (1994-03-11) page 1, ligne 33 - page 7, ligne 2	1-4, 8, 11, 21, 22, 46
Y	---	13, 14, 25
X	WO 90 11770 A (CALGENE INC) 18 octobre 1990 (1990-10-18) page 1 - page 19	1-4, 8, 11, 17, 18, 21-24, 28-46
X	FR 2 725 992 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 26 avril 1996 (1996-04-26) cité dans la demande le document en entier	1-4, 8, 11, 21, 22

	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 août 1999

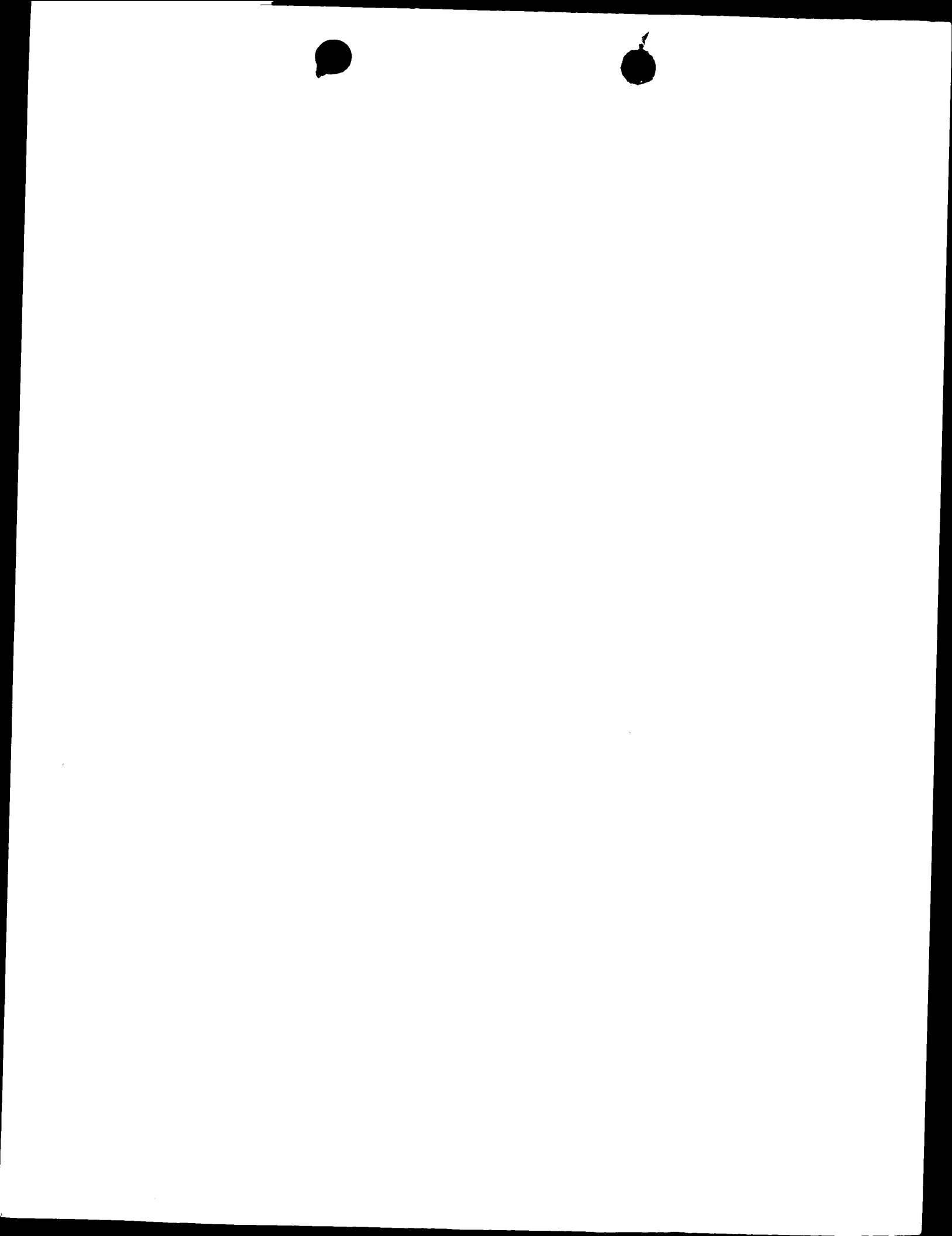
Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/09/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHUNG K T ET AL: "Antibacterial factors in immune hemolymph from heliothis virescens larvae" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 96, no. 0, 19 mai 1996 (1996-05-19), page 275 XP002089180 WASHINGTON US abrégé	13,14,25
A	DE 22 12 854 A (WSESOJUSNYJ NAUTSCHNO) 2 novembre 1972 (1972-11-02) le document en entier	1,21,22, 46
A	WO 97 30082 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 21 août 1997 (1997-08-21) le document en entier & FR 2 745 004 A cité dans la demande	1,21,22
A	EP 0 307 841 A (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 22 mars 1989 (1989-03-22) le document en entier	17,19, 20,23, 25,26, 29,30, 35,36
A	EP 0 607 080 A (TRANSGENE SA) 20 juillet 1994 (1994-07-20) page 2, ligne 28 - ligne 53	17-19
A	HOFFMANN J A ET AL.: "Insect defensins: inducible antibacterial peptides" IMMUNOLOGY TODAY., vol. 13, no. 10, 1992, pages 411-415, XP002089181 CAMBRIDGE GB le document en entier	1-46
P,X	LAMBERTY M ET AL.: "Insect immunity - Isolation from the lepidopteran Heliothis virescens of a novel insect defensin with potent antifungal activity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 274, no. 14, 2 avril 1999 (1999-04-02), pages 9320-9326, XP002112857 BALTIMORE, US ISSN: 0021-9258 le document en entier	1-25



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 99/00843

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2695392	A	11-03-1994	NONE	
WO 9011770	A	18-10-1990	CA 2030779 A EP 0425616 A	12-10-1990 08-05-1991
FR 2725992	A	26-04-1996	NONE	
DE 2212854	A	02-11-1972	CH 568387 A FR 2130267 A GB 1355163 A	31-10-1975 03-11-1972 05-06-1974
WO 9730082	A	21-08-1997	FR 2745004 A AU 1884397 A CA 2245518 A CN 1216047 A EP 0882063 A PL 328579 A	22-08-1997 02-09-1997 21-08-1997 05-05-1999 09-12-1998 01-02-1999
EP 0307841	A	22-03-1989	AU 2487788 A WO 8902437 A	17-04-1989 23-03-1989
EP 0607080	A	20-07-1994	FR 2700338 A	13-07-1994



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 15/82, A61K 38/17, C12P 21/02, C12N 15/62, 15/81		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/53053 (43) Date de publication internationale: 21 octobre 1999 (21.10.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00843 (22) Date de dépôt international: 12 avril 1999 (12.04.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/04933 15 avril 1998 (15.04.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LAMBERTY, Mireille [FR/FR]; 30, rue Benfeld, F-67100 Strasbourg (FR). BULET, Philippe [FR/FR]; 11, rue du Cottage, F-67550 Vendenheim (FR). BROOKHART, Gary, Lee [US/US]; 4903 Victoria Drive, Durham, NC 27713 (US). HOFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR). (74) Représentant commun: RHONE-POULENC AGRO; Boîte postale 9163, F-69263 Lyon cedex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: GENE CODING FOR HELIOMICINE AND USE THEREOF (54) Titre: GENE CODANT POUR L'HELIOMICINE ET SON UTILISATION (57) Abstract <p>The invention concerns heliomicine, a DNA sequence coding for heliomicine, a vector containing it for transforming a host organism and the transformation method. The invention concerns heliomicine as medicine in particular for treating fungal infections. More particularly it concerns the transformation of plant cells and plants, the heliomicine produced by the transformed plants ensuring their resistance to diseases, in particular diseases of fungal origin.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet l'héliomicine, une séquence d'ADN codant pour l'héliomicine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation. L'invention concerne l'utilisation de l'héliomicine à titre de médicament, en particulier pour le traitement des infections fongiques. L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, l'héliomicine produite par les plantes transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

GENE CODANT POUR L'HELIOMICINE ET SON UTILISATION

5 La présente invention a pour objet un nouveau peptide riche en cystéines appelé héliomicine, son utilisation a titre de médicament et les compositions le comprenant, une séquence d'ADN codant pour ce peptide, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation dudit organisme.

10 L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, l'héliomicine produite par les plantes transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

Il existe aujourd'hui un besoin grandissant de rendre les plantes résistantes contre les maladies notamment fongiques afin de diminuer, voire d'éviter, d'avoir recours à des traitements avec des produits de protection antifongiques, en vue de protéger
15 l'environnement. Un moyen d'augmenter cette résistance aux maladies consiste à transformer les plantes de manière qu'elles produisent des substances à même d'assurer leur défense contre ces maladies.

Dans le domaine de la santé humaine, il existe des infections fongiques opportunistes pour lesquelles aucun traitement réellement efficace n'est disponible à
20 l'heure actuelle. En particulier, c'est le cas de certaines mycoses invasives graves qui touchent des patients hospitalisés dont le système immunitaire est déprimé à la suite d'une transplantation, d'une chimiothérapie ou de l'infection par le VIH. En comparaison de l'arsenal des agents antibactériens, la panoplie actuelle des agents antifongiques est très limitée. Il existe donc un besoin réel de caractériser et de développer de nouvelles classes
25 de substances antifongiques.

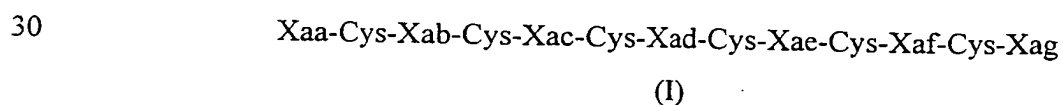
On connaît différentes substances d'origine naturelle, en particulier des peptides, présentant des propriétés bactéricides ou fongicides, notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes. Toutefois, un premier problème consiste à trouver de telles substances qui pourront non seulement être produites par des plantes
30 transformées, mais encore conserver leurs propriétés bactéricides ou fongicides et les conférer aux dites plantes. Au sens de la présente invention, on entend par bactéricide ou fongicide tant les propriétés bactéricides ou fongicides proprement dites que les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques.

On connaît également des peptides riches en cystéines présentant des activités bactéricides ou bactériostatiques, mais qui ne présentent pas d'activité fongicide ou fongistatique. Un autre problème consiste à trouver un peptide riche en cystéines présentant une forte activité fongicide ou fongistatique par rapport aux peptides de l'état de la technique.

L'héliomicine est un peptide isolé à partir de l'hémolymphe du lépidoptère *Heliothis virescens* qui présente une activité fongicide contre les champignons responsables des maladies des plantes et les champignons de la pathologie humaine et animale. Après avoir d'abord synthétisé le gène de l'héliomicine, on a également trouvé qu'il pouvait être inséré dans un organisme hôte, comme une levure ou une plante, pour exprimer l'héliomicine et soit produire de l'héliomicine purifiée ou non, soit conférer au dit organisme hôte des propriétés de résistance aux maladies fongiques, apportant une solution particulièrement avantageuse aux problèmes énoncés ci-dessus.

L'invention a donc d'abord pour objet l'héliomicine, son utilisation a titre de médicament ou en agrochimie pour la protection des plantes, les compositions le comprenant, un fragment d'acide nucléique codant pour l'héliomicine, un gène chimère comprenant ledit fragment codant pour l'héliomicine ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier dans les levures ou les plantes et un vecteur pour la transformation des organismes hôtes contenant ce gène chimère, et l'organisme hôte transformé. Elle concerne aussi une cellule végétale transformée contenant au moins un fragment d'acide nucléique codant pour l'héliomicine et une plante résistante aux maladies contenant la dite cellule, en particulier régénérée à partir de cette cellule. Elle concerne enfin un procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies dans lequel on insère un gène codant pour l'héliomicine au moyen d'un vecteur approprié. Elle concerne enfin un procédé de préparation de l'héliomicine par des organismes hôtes transformés.

Par héliomicine, on entend selon l'invention tout peptide comprenant essentiellement la séquence peptidique de formule (I) ci-dessous,



dans laquelle:

Xaa est -NH₂ ou un reste peptidique comprenant de 1 à 10 acides aminés, de

préférence de 1 à 6 acides aminés,

Xab est un reste peptidique comprenant de 1 à 10 acides aminés, de préférence 10,

Xac est un reste peptidique de 3 acides aminés,

Xad est un reste peptidique comprenant de 1 à 9 acides aminés, de préférence 9,

5 Xae est un reste peptidique comprenant de 1 à 7 acides aminés, de préférence 7,

Xaf est un reste peptidique de 1 acide aminé, et

Xag est -OH ou un reste peptidique comprenant de 1 à 5 acides aminés, de préférence 1 ou 2 acides aminés.

10 Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, Xaa comprend au moins un acide aminé basique, et/ou Xad comprend au moins un acide aminé basique. De manière avantageuse, Xad comprend 1, 2, 3 ou 4 acides aminés basiques.

De manière avantageuse, Xad représente la séquence peptidique suivante -Lys-Xad'-Xad"-Gly-His-, dans laquelle Xad' représente un reste peptidique de 1 acide aminé basique et Xad" représente un reste peptidique comprenant de 0 à 5 acides aminés, de
15 préférence 5.

Par acides aminés basiques, on entend plus particulièrement selon l'invention les acides aminés choisis parmi la lysine, l'arginine ou l'homoarginine.

De manière préférentielle, Xad représente la séquence peptidique suivante -Lys-Arg-Arg-Gly-Tyr-Lys-Gly-Gly-His- ou -Leu-Leu-Arg-Gly-Tyr-Lys-Gly-Gly-His-.

20 Selon un autre mode préférentiel de réalisation de l'invention, Xac comprend au moins un acide aminé acide, de préférence un.

De manière avantageuse, Xac représente la séquence peptidique suivante -Asn-Xac'-Xac"-, dans laquelle Xac' représente un reste peptidique de 1 acide aminé, et Xac" représente un reste peptidique de 1 acide aminé acide.

25 Par acide aminé acide on entend selon l'invention tout acide aminé comprenant sur une chaîne latérale une fonction acide organique, plus particulièrement acide carboxylique, de préférence choisi parmi l'acide glutamique (Glu) ou l'acide aspartique (Asp).

De manière préférentielle, Xac représente la séquence peptidique suivante -Asn-Gly-Glu- ou -Ala-Ala-Glu-.

30 De manière avantageuse,

Xaa représente la séquence peptidique suivante Xaa'-Gly-Xaa''- dans laquelle Xaa' représente NH₂ ou un reste peptidique comprenant 1 à 9 acides aminés, de préférence 1 à 5 acides aminés, et Xaa'' représente un reste peptidique comprenant au moins un acide

aminé, choisi de préférence parmi Leu, Ile, Val, Pro, Ser ou Thr, et/ou

Xab représente la séquence peptidique suivante -Val-Xab'-Asp-, dans laquelle Xab' représente un reste peptidique comprenant de 0 à 8 acides aminés, de préférence 8, et/ou

Xae représente la séquence peptidique suivante -Gly-Xae'-Asn-, dans laquelle Xae' représente un reste peptidique comprenant de 0 à 5 acides aminés, de préférence 5, et/ou

Xaf représente un des acides aminés suivant -Trp-, Phe, Leu, Ile ou Val et/ou

Xag représente la séquence peptidique suivante -Glu-Xag' dans laquelle Xag' représente OH ou un reste variable de séquence comprenant de 1 à 4 acides aminés, de préférence 1 acide aminé.

10 Selon un mode de réalisation plus préférentiel de l'invention, Xaa représente la séquence peptidique suivante NH₂-Asp-Lys-Leu-Ile-Gly-Ser- ou NH₂-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Ser-, et/ou Xab représente la séquence peptidique suivante -Val-Trp-Gly-Ala-Val-Asn-Tyr-Thr-Ser-Asp-, et/ou Xae représente la séquence peptidique suivante -Gly-Ser-Phe-Ala-Asn-Val-Asn-, et/ou Xaf représente l'acide aminé suivant -Trp-, et/ou Xag
15 représente la séquence peptidique suivante -Glu-Thr-OH ou -Arg-Thr-OH.

Selon un mode de réalisation plus préférentiel de l'invention, l'héliomicine est le peptide représenté avec sa séquence codante par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2). La même séquence est décrite, correspondant aux acides aminés 6 à 49 de l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1) avec une séquence codante différente.

20 Le résidu NH₂ terminal peut présenter une modification post-traductionnelle, par exemple une acétylation, de même que le résidu C-terminal peut présenter une modification post-traductionnelle, par exemple une amidation.

Par séquence peptidique comprenant essentiellement la séquence peptidique de formule générale (I), on entend non seulement les séquences définies ci-dessus, mais
25 également de telles séquences comprenant à l'une ou l'autre de leurs extrémités, ou les deux, des résidus peptidiques nécessaires à leur expression et ciblage dans un organisme hôte. Par organisme hôte on entend tout organisme comprenant au moins une cellule, qu'il s'agisse de microorganismes, en particulier une levure ou une bactérie, ou encore de cellules végétales ou encore d'organismes supérieurs comme les plantes.

30 Il s'agit en particulier d'un peptide de fusion « peptide-héliomicine », dont la coupure par les systèmes enzymatiques de l'organisme hôte permet la libération de l'héliomicine, l'héliomicine étant définie ci-dessus. Le peptide fusionné à l'héliomicine peut être un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la

production de l'héliomicine de manière spécifique dans une partie de l'organisme hôte, comme par exemple le cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de compartiments cellulaires ou de tissus ou dans la matrice extracellulaire.

5 Selon un mode de réalisation, le peptide de transit peut être un signal d'adressage chloroplastique ou mitochondrial, lequel est ensuite clivé dans les chloroplastes ou les mitochondries.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide signal peut être un signal N-terminal ou « prépeptide », éventuellement en association avec un signal
10 responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide d'adressage vacuolaire ou « propeptide ». Le réticulum endoplasmique est le lieu où sont pris en charge par la « machinerie cellulaire » des opérations de maturation de la protéine produite, comme par exemple le clivage du peptide signal.

Les peptides de transit peuvent être soit simples, soit doubles, et dans ce cas
15 éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour
20 une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande EP 0 508 909.

Comme peptide de transit utile selon l'invention, on peut citer en particulier le peptide signal du gène PR-1 α du tabac décrit par Cornelissen & coll., représenté avec sa séquence codante par l'identificateur de séquence n° 2, en particulier lorsque l'héliomicine est produite par des cellules végétales ou des plantes, ou du précurseur du facteur Mat α 1
25 lorsque l'héliomicine est produite dans des levures.

Le peptide de fusion « MF α 1/héliomicine » avec les cinq résidus du propeptide du facteur MF α 1 (Ser-Leu-Asp-Lys-Arg), situés en position N-terminale et sa séquence codante sont partie de la présente invention, en particulier décrits par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), correspondants aux acides aminés 1 à 49.

30 Le peptide de fusion « peptide signal PR-1 α -héliomicine » et sa séquence codante sont également partie de la présente invention, en particulier décrits par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3).

Le peptide de fusion comprenant le peptide signal du gène PG1 de

polygalacturonase de maïs fusionné à l'héliomicine « peptide signal PG1/héliomicine » est représenté avec sa séquence codante par les identificateurs de séquences n° 18 et 20 (SEQ ID NO 18 et SEQ ID NO 20).

5 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les résidus cystéines du peptide de formule (I) forment au moins un pont disulfure intramoléculaire, de préférence trois ponts disulfure. Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention les ponts disulfure sont établis entre les résidus cystéine 1 et 4, 2 et 5 et 3 et 6.

10 L'héliomicine est un peptide particulièrement actif contre les champignons et les levures, et peut être à ce titre employé à titre préventif ou curatif pour protéger différents organismes contre des agressions fongiques. La présente invention concerne donc l'héliomicine à titre de médicament. Elle concerne également l'utilisation de l'héliomicine pour le traitement des plantes contre des agressions fongiques, en appliquant l'héliomicine directement sur les dites plantes.

15 La présente invention concerne également une composition comprenant l'héliomicine et un véhicule approprié. Le véhicule approprié a pour première qualité de ne pas dégrader de manière substantielle l'héliomicine dans la composition, et de ne pas diminuer les propriétés bactéricides et fongicides de l'héliomicine. Cette composition peut être une composition cosmétique et dans ce cas le véhicule approprié est cosmétiquement acceptable (adapté en outre pour une application sur la peau ou les phanères), ou une
20 composition pharmaceutique pour un usage thérapeutique et dans ce cas le véhicule approprié est pharmaceutiquement acceptable approprié pour une administration de l'héliomicine par voie topique, per os ou par injection, ou encore une composition agrochimique et dans ce cas le véhicule approprié est agrochimiquement acceptable, approprié pour une application sur les plantes ou à proximité des plantes, sans les
25 dégrader.

La présente invention concerne également un fragment d'acide nucléique, en particulier d'ADN, naturel ou synthétique, codant pour l'héliomicine définie ci-dessus, y compris pour le peptide de fusion « peptide-héliomicine » défini ci-dessus. Il peut s'agir selon l'invention d'un fragment synthétisé ou isolé du lépidoptère *Heliothis*, ou encore un
30 fragment dérivé, adapté pour l'expression de l'héliomicine dans l'organisme hôte où le peptide sera exprimé. Le fragment d'acide nucléique peut être obtenu selon les méthodes standards d'isolation et de purification, ou encore par synthèse selon les techniques usuelles d'hybridations successives d'oligonucléotides synthétiques. Ces techniques sont

notamment décrites par Ausubel *et al.*

Selon la présente invention, on entend par « fragment d'acide nucléique » une séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin.

5 Selon un mode de réalisation de l'invention, le fragment d'acide nucléique codant pour l'héliomicine comprend la séquence d'ADN décrite par les bases 16 à 147 de l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), ou par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2), en particulier la partie codante de cette séquence correspondant aux bases 1 à 132, une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

10 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le fragment d'acide nucléique codant pour le peptide de fusion « peptide-héliomicine » comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n°1 (SEQ ID NO 1) ou celle décrite par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3), en particulier la partie codante correspondant aux bases 3 à 224, ou celle décrite par l'identificateur de séquence n° 18
15 (SEQ ID NO 18), en particulier la partie codante correspondant aux bases 7 à 205, une séquence homologue ou une séquence complémentaire des dites séquences.

Par « homologue », on entend selon l'invention un fragment d'acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence nucléotidique décrite par les identificateurs de séquences n° 1, 2 ou 3 et codant pour
20 l'héliomicine ou le peptide de fusion « peptide-héliomicine ». Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou encore en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre la séquence de référence
25 décrite par les identificateurs de séquences n° 1, 2 ou 3 et l'homologue correspondant peuvent être importantes, d'autant plus qu'il s'agit de fragments d'ADN de faible taille réalisables par synthèse chimique. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 70 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 80 %, plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications sont généralement neutres,
30 c'est à dire qu'elles n'affectent pas la séquence primaire de l'héliomicine ou du peptide de fusion résultants.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en

position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, la séquence codante comprenant au moins un fragment d'ADN codant pour l'héliomicine ou le peptide de fusion « peptide-héliomicine » tel que définis ci-dessus.

5 Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être introduit, pour la production d'héliomicine. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, de champignons, en particulier *Aspergillus*, d'un baculovirus, ou de préférence des cellules
10 végétales et des plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié
15 capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN codant
20 pour l'héliomicine sont bien connus de l'homme du métier en fonction de l'organisme hôte. Ils comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier.

25 Pour la transformation des microorganismes comme les levures ou les bactéries, les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier, et comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des peptides de transit, des séquences terminatrices et des codons start et stop.

Pour diriger l'expression et la sécrétion du peptide dans le milieu de culture de la
30 levure, un fragment d'ADN codant l'héliomicine est intégré dans un vecteur navette qui comprend les éléments suivants :

- des marqueurs permettant de sélectionner les transformants. De préférence, on utilise le gène *ura-3* pour la levure et le gène qui confère la résistance à l'ampicilline pour *E. coli*,

- une séquence nucléique permettant la réplication (origine de réplication) du plasmide dans la levure. De préférence on utilise l'origine de réplication du plasmide 2 μ de levure,
- une séquence nucléique permettant la réplication (origine de réplication) du plasmide dans *E. coli*,

5 - une cassette d'expression constituée

(1) d'une séquence de régulation promotrice. On peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans la levure. De préférence, on utilise le promoteur du gène *Mf α 1* de *S. cerevisiae*.

(2) d'une séquence codant pour un peptide signal (ou prépeptide) en association avec un peptide d'adressage (ou propeptide). Ces régions sont importantes pour la sécrétion correcte du peptide. De préférence, on utilise la séquence codant le pré-pro-peptide du précurseur du facteur *Mf α 1*.

(3) d'une séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation. De préférence, on utilise le terminateur de la phosphoglycérate kinase (PGK) de *S. cerevisiae*.
15 Dans la cassette d'expression, la séquence codant l'héliomicine est insérée en aval de la séquence pré-pro et en amont du terminateur de la PGK.

Ces éléments ont été décrits dans plusieurs publications dont Reichhart *et al.*, 1992, Invert. Reprod. Dev., 21, pp 15-24 et Michaut *et al.*, 1996, FEBS Letters, 395, pp 6-10 .

De manière préférentielle, on transforme des levures de l'espèce *S. cerevisiae* avec le plasmide d'expression par la méthode à l'acétate de lithium (Ito *et al.*, 1993, J. Bacteriol, 153, pp 163-168). Les levures transformées sont sélectionnées sur un milieu gélosé sélectif qui ne contient pas d'uracile. La production en masse des levures transformées est réalisée par culture pendant 24h à 48 h dans un milieu liquide sélectif.

La transformation de microorganismes permet de produire de l'héliomicine à plus large échelle. La présente invention concerne donc également un procédé de préparation de l'héliomicine, comprenant les étapes de culture d'un micro organisme transformé comprenant un gène codant pour l'héliomicine tel que défini ci-dessus dans un milieu de culture approprié, puis l'extraction et la purification totale ou partielle de l'héliomicine obtenue.

30 De manière préférée, lors de l'extraction de l'héliomicine produite par les levures, on élimine les levures par centrifugation et on met en contact le surnageant de culture avec une solution acide qui peut être une solution d'un acide minéral ou organique comme par exemple l'acide chlorhydrique ou de l'acide acétique. L'extrait obtenu est ensuite

centrifugé à froid à une vitesse de 4000 à 10.000 rpm à 4°C, pendant 30 à 60 min.

La purification de l'héliomicine peut être précédée d'une étape de fractionnement du surnageant obtenu suite à l'étape d'extraction. De manière préférée, au cours de l'étape de fractionnement, l'extrait est déposé sur de la phase inverse pour réaliser une extraction en phase solide. Le lavage des molécules solubles dans l'eau est effectué avec une solution acide diluée et l'élution des molécules hydrophobes avec un éluant approprié. On obtient de bons résultats avec de l'acide trifluoroacétique pour le lavage et un éluant contenant des quantités croissantes d'acétonitrile en solution acide diluée.

De manière préférée la purification de l'héliomicine est effectuée en deux temps : une HPLC en échange de cations suivie d'une HPLC en phase inverse avec un éluant convenable qui peut être différent ou identique à celui de la phase précédente. Les différentes étapes de la purification sont suivies par un test d'inhibition de croissance fongique en milieu liquide. De préférence, le test est effectué avec le champignon *Neurospora crassa*.

La séquence de l'héliomicine produite par les levures transformées est analysée selon la méthode de séquençage par dégradation d'Edman et par spectrométrie de masse. La caractérisation structurale est réalisée directement sur le peptide produit, sur le peptide modifié par réduction/alkylation ainsi que sur des fragments du peptide. La séquence peptidique et la masse moléculaire de l'héliomicine produite ont été comparées avec celles de l'héliomicine native extraite de l'hémolymph de *H. virescens*. Les résultats montrent que les deux molécules présentent la même structure primaire. La détermination de la position des ponts disulfure indique que l'arrangement des ponts disulfures est identique dans les deux peptides, natif et produit par le microorganisme transformé.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) ou d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), ou un promoteur inductible par les pathogènes comme le PR-la du tabac, tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante de manière constitutive ou induite par l'attaque d'un pathogène, tel que par exemple, celle

comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par
5 exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur
10 nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon la présente invention, le gène chimère peut également être associé à un marqueur de sélection adapté à l'organisme hôte transformé. De tels marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme du métier. Il pourra s'agir d'un gène de résistance
aux antibiotiques, ou encore un gène de tolérance aux herbicides pour les plantes.

15 La présente invention concerne également un vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de répllication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon
20 l'invention. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression. De manière
25 préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins un fragment d'acide nucléique ou un gène chimère tels que définis ci-dessus, transformation qui peut être
30 obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des

tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

5 D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

10 La présente invention a encore pour objet les organismes hôtes, en particulier cellules végétales ou plantes, transformés et contenant une quantité efficace d'un gène chimère comprenant une séquence codante pour l'héliomicine définie ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépende de la nature de l'espèce,
15 comme par exemple décrit dans les références ci-dessus.

Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US
20 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de
25 plantes transformées.

Les plantes ainsi transformées sont résistantes à certaines maladies, en particulier à certaines maladies fongiques ou bactériennes. De ce fait, la séquence d'ADN codant pour l'héliomicine peut être intégrée avec pour objectif principal la réalisation de plantes résistantes aux dites maladies, l'héliomicine étant efficace contre des maladies fongiques
30 telles que celles causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.

Le gène chimère pourra comprendre également et de manière avantageuse au moins un marqueur de sélection, tel qu'un ou plusieurs gènes de tolérance aux herbicides.

La séquence d'ADN codant pour l'héliomicine peut également être intégrée comme marqueur de sélection lors de la transformation de plantes avec d'autres séquences codant
5 pour d'autres peptides ou protéines d'intérêt, comme par exemple des gènes de tolérance aux herbicides.

De tels gènes de tolérance aux herbicides sont bien connus de l'homme du métier et notamment décrits dans les demandes de brevet EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

10 Bien entendu, les cellules et plantes transformées selon l'invention peuvent comprendre outre la séquence codant pour l'héliomicine, d'autres séquences hétérologues codant pour des protéines d'intérêt comme d'autres peptides complémentaires susceptibles de conférer à la plante des résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou fongique, et/ou d'autres séquences codant pour des protéines de tolérance aux herbicides
15 et/ou d'autres séquences codant pour des protéines de résistance aux insectes, comme les protéines *Bt* notamment.

Les autres séquences peuvent être intégrées au moyen du même vecteur comprenant un gène chimère, lequel comprend une première séquence codant pour l'héliomicine et au moins une autre séquence codant pour un autre peptide ou protéine
20 d'intérêt.

Elles peuvent également être intégrées au moyen d'un autre vecteur comprenant au moins la dite autre séquence, selon les techniques usuelles définies ci-dessus.

Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, l'un portant le gène selon l'invention codant pour l'héliomicine, l'autre portant un
25 gène codant pour au moins un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Parmi les séquences codant pour d'autres peptides antifongiques, on peut citer celle codant pour la drosomycine, décrite dans la demande de brevet FR 2 725 992 et par Fehlbaum & coll. (1994), et dans la demande de brevet non publiée FR 97 09115 déposée le 24 juillet 1997, ou celle codant pour l'androctonine décrite dans la demande de brevet
30 FR 2 745 004 et dans la demande de brevet non publiée FR 97 10362 déposée le 20 août 1997.

La présente invention concerne enfin un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention, le procédé consistant à planter les graines des dites plantes

transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une composition agrochimique, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

Par composition agrochimique, on entend selon l'invention toute composition agrochimique comprenant au moins un produit actif ayant l'une des activités suivantes, herbicide, fongicide, bactéricide, virucide ou insecticide.

Selon un mode préférentiel de réalisation du procédé de culture selon l'invention, la composition agrochimique comprend au moins un produit actif ayant au moins une activité fongicide et/ou bactéricide, plus préférentiellement présentant une activité complémentaire de celle de l'héliomicine produite par les plantes transformées selon l'invention.

Par produit présentant une activité complémentaire de celle de l'héliomicine, on entend selon l'invention un produit présentant un spectre d'activité complémentaire, c'est à dire un produit qui sera actif contre des attaques de contaminants (champignons, bactéries ou virus) insensibles à l'héliomicine, ou encore un produit dont le spectre d'activité recouvre celui de l'héliomicine, totalement ou en partie, et dont la dose d'application sera diminuée de manière substantielle du fait de la présence de l'héliomicine produite par la plante transformée.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

Exemple I : Isolement et caractérisation de l'héliomicine à partir de l'hémolymph
prélevée chez des larves immunisées du lépidoptère *H. virescens*

Exemple I.1 : Isolement

1-1 Induction de la synthèse biologique d'une substance antifongique dans l'hémolymph d' *H. virescens*

Les larves matures de 5ème stade du lépidoptère *H. virescens* ont été immunisées à l'aide d'une aiguille (30 ga) préalablement plongée dans un culot de bactéries à Gram positif (*M. luteus*) et à Gram négatif (*E. coli* 1106) préparé à partir de cultures réalisées en milieu de Luria-Bertani durant 12 heures à 37°C. Les animaux ainsi infectés ont été conservés individuellement dans des tubes contenant un milieu nutritif à base d'agar

pendant 24 heures entre 20°C et 23°C. Avant le prélèvement de l'hémolymphes les larves ont été refroidies sur de la glace.

1-2 Préparation du plasma

L'hémolymphes (environ 30 µl par larve) a été collectée par excision d'un appendice abdominal et recueillie dans des tubes de microcentrifugation en polypropylène de 1,5 ml refroidis dans de la glace et contenant de l'aprotinine comme inhibiteur de protéases (20µg/ml en concentration finale) et de la phénylthiourée comme inhibiteur de la mélanisation (concentration finale de 20µM). L'hémolymphes (2 ml) ainsi collectée à partir des larves immunisées a été centrifugée à 14000 g pendant 1 min à 4 °C afin de retirer les hémocytes. L'hémolymphes dépourvue des cellules sanguines a été conservée à -20°C jusqu'à son utilisation.

1-3 Acidification du plasma

Après décongélation rapide, le plasma d' *H. virescens* a été acidifié jusqu'à pH 3 avec une solution d'acide trifluoroacétique à 1%. L'extraction en condition acide du peptide a été réalisée pendant 30 min sous agitation légère dans un bain d'eau glacée. L'extrait obtenu a été ensuite centrifugé à 4°C pendant 30 min à 10 000g.

I-4 Purification des peptides

a) Prépurification par extraction en phase solide

Une quantité d'extrait équivalente à 2ml d'hémolymphes a été déposée sur un support de phase inverse, tel que commercialisé sous la forme de cartouche (Sep-Pak™ C18, Waters Associates), équilibré avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les molécules hydrophiles ont été éliminées par un simple lavage avec de l'eau acidifiée. L'élution du peptide a été réalisée par une solution d'acétonitrile à 40% préparée dans le TFA 0,05%. La fraction éluée à 40% d'acétonitrile a été séchée sous vide dans le but d'éliminer l'acétonitrile et le TFA puis elle a été reconstituée dans de l'eau ultrapure stérile avant d'être soumise à la première étape de purification.

b) Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne de phase inverse.

-première étape : la fraction contenant le peptide a été analysée par chromatographie de phase inverse sur une colonne semi-préparative Aquapore RP-300 C₈ (Brownlee™, 220 x 70 mm, 300 Å), l'élution a été réalisée par un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 60% dans le TFA 0,05% pendant 120 minutes à un débit constant de 1,5ml/min. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de

l'absorbance à 225 nm et 254 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antifongique en utilisant le test décrit ci-dessous.

5 - **deuxième étape** : la fraction antifongique correspondant au peptide a été analysée sur une colonne analytique de phase inverse Aquapore RP-300 C₈ (Brownlee™, 220 x 4,6 mm, 300 Å), en utilisant un gradient linéaire diphasique d'acétonitrile de 2% à 22% en 10 min et de 22 à 32% en 50 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 0,8 ml/min. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm et 254 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antifongique dans les conditions décrites ci-dessous.

15 - **troisième étape** : la fraction antifongique contenant le peptide a été purifiée jusqu'à homogénéité sur une colonne de phase inverse Narrowbore Delta-Pak™ HPIC₁₈ (Waters Associates, 150 x 2,2 mm) eu utilisant un gradient linéaire diphasique d'acétonitrile de 2% à 24% en 10 min et de 24 à 44% en 100 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 0,25 ml/min à une température contrôlée de 30°C. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure filtrée et analysées pour leur activité antifongique.

20 **Exemple I.2 : caractérisation structurale du peptide**

2-1 Vérification de la pureté par électrophorèse capillaire de zone

La pureté du peptide antifongique a été vérifiée par électrophorèse capillaire de zone sur un modèle 270-HT (PEApplied Biosystems division de Perkin Elmer). 1nl d'une solution à 50µM de peptide purifié a été injecté sous assistance par le vide dans un capillaire de silice (72 cm x 50 µm) et l'analyse a été réalisée en tampon citrate 20 mM à pH 2,5. L'électrophorèse a été réalisée à 20 kV de l'anode à la cathode pendant 20 min à 30°C. La migration a été enregistrée à 200 nm.

2-2 Détermination du nombre des cystéines : réduction et S-pyridyléthylation.

30 Le nombre de résidus cystéine a été déterminé sur le peptide natif par réduction et S-pyridyléthylation. 100 pmoles de peptide natif ont été réduites dans 40 µl de tampon Tris/HCl 0,5 M, pH 7,5 contenant 2 mM d'EDTA et 6 M de chlorure de guanidinium en présence de 2 µl de dithiothréitol 2,2 M. Le milieu réactionnel a été placé sous atmosphère d'azote. Après 60 min d'incubation à l'obscurité, 2 µl de 4-vinylpyridine fraîchement

distillée ont été ajoutés à la réaction qui a été alors incubée durant 10 min à 45°C à l'obscurité et sous atmosphère d'azote. Le peptide pyridyléthylé a été ensuite séparé des constituants du milieu réactionnel par chromatographie de phase inverse en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile en présence de TFA 0,05%.

5 **2-3 Détermination de la masse du peptide natif, du peptide S-pyridyléthylé et des fragments de protéolyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight).**

Les mesures de masses ont été effectuées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker Biflex (Bremen, Allemagne) en mode linéaire positif. Les spectres de masse
10 ont été calibrés de façon externe avec un mélange standard de peptides de m/z connues, respectivement 2199.5 Da, 3046.4 Da et 4890.5 Da. Les différents produits à analyser ont été déposés sur une fine couche de cristaux d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique obtenue par une évaporation rapide d'une solution saturée dans l'acétone. Après séchage sous un léger vide, les échantillons ont été lavés par une goutte d'acide trifluoroacétique à
15 0,1% avant d'être introduits dans le spectromètre de masse.

2-4 Séquençage par dégradation d'Edman.

Le séquençage automatique par dégradation d'Edman du peptide natif, du peptide S-pyridyléthylé et des différents fragments obtenus après les différents clivages protéolytiques et la détection des dérivés phénylthiohydantoïnes ont été réalisés sur un
20 séquenceur ABI473A (PEApplied Biosystems division de Perkin Helmer).

2-5 Clivages protéolytiques.

- Confirmation de la séquence peptidique dans la région C-terminale.

200 pmoles de peptide réduit et S-pyridyléthylé ont été incubées en présence de 5 pmoles d'endoprotéinase-Lys-C (*Acromobacter* protease I, clivage spécifique des résidus
25 lysine du côté C-terminal, Takara, Otsu) selon les conditions préconisées par le fournisseur (Tris HCl 10 mM pH 9 en présence de Tween 20 à 0,01%). Après arrêt de la réaction avec du TFA 1%, les fragments peptidiques ont été séparés par HPLC en phase inverse sur une colonne de type Narrowbore Delta-Pak™ HPIC₁₈ (Waters Associates, 150 x 2 mm) dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 60% en 80 min dans le TFA 0,05% avec un débit
30 de 0,2 ml/min et une température constante de 37°C. Les fragments obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et le peptide correspondant au fragment C-terminal a été séquencé par dégradation d'Edman.

-Détermination de l'arrangement des ponts disulfure par protéolyse à la

thermolysine.

Le peptide natif (8 µg) a été incubé durant 1 heure en présence de 4 µg de thermolysine (Boehringer Mannheim, rapport thermolysine/peptide, 1/2 en poids : poids) à 37°C dans le tampon MES (N-éthylmorpholine) 0,1 M à pH 7 en présence de 2 mM de CaCl₂. La réaction a été arrêtée par addition d'acide formique et les produits de la réaction ont été immédiatement séparés par chromatographie de phase inverse sur une colonne Narrowbore Delta-Pak™ HPIC₁₈ (Waters Associates, 150 x 2,2 mm) dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 50% en 100 min dans du TFA 0,05% au débit de 0,2 ml/min à 30°C précédée d'une étape isocratique à 2 % d'acétonitrile pendant 10 min. Les fragments obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquencés par dégradation d'Edman.

Exemple II : Expression de l'héliomicine dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standards de laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques ont été notamment décrits dans Ausubel *et al.*

Exemple II-1 Assemblage du gène synthétique

L'assemblage a été réalisé à partir de 6 oligonucléotides synthétiques codant pour les 44 acides aminés de l'héliomicine précédés des 5 acides aminés C-terminaux de la préproséquence du facteur a1 (Mfa1) de la levure. Les oligonucléotides représentés sur la figure 1 ont été choisis en tenant compte des codons préférentiels utilisés par *S. cerevisiae*.

L'assemblage s'est déroulé en plusieurs étapes :

- les oligonucléotides 2 à 5 ont été phosphorylés à leurs extrémités 5' par action de la polynucléotide kinase (New England Biolabs) ;
- les oligonucléotides 1 à 6 ont été mélangés, chauffés à 100°C et hybridés par diminution lente de la température à 25 °C pendant 3 heures ;
- les oligonucléotides hybridés ont été soumis à un traitement par la ligase du bactériophage T4 (New England Biolabs) pendant 15 heures à 15° C ;
- le bloc d'ADN résultant de l'hybridation des oligonucléotides représenté sur la figure 1, borné par les sites de restriction *Hin*DIII et *Bgl*II, a été inséré dans le plasmide pBluescript SK+ (Stratagène) digéré par les enzymes *Hin*DIII et *Bam*HI (*Bgl*II et *Bam*HI sont compatibles). Le mélange de ligation a ensuite été utilisé pour transformer des cellules compétentes d' *E. coli* DH5α. (Stratagène). Plusieurs clones ont été analysés et

séquencés. Un de ces clones qui présentait la séquence recherchée a été appelé pSEA1.

Exemple II-2 : Construction du vecteur pSEA2 qui permet la sécrétion de l'héliomicine synthétisée.

Le fragment d'ADN HindIII-SalI du vecteur pSEA1, portant la séquence codant l'héliomicine ainsi que le fragment SphI-HindIII du vecteur M13JM132 (Michaut *et al.*, 1985, FEBS Letters, 395, pp 6-10) ont été insérés entre les sites SphI et SalI du plasmide pTG4812 (Michaut *et al.*, 1996, FEBS Letters, 395, pp 6-10). Le fragment SphI-HindIII du vecteur M13JM132 contient la séquence du promoteur du gène MF α 1 de la levure ainsi que la séquence codant la région pré-pro du facteur MF α 1. Dans le plasmide résultant, pSEA2, le gène synthétique de l'héliomicine se retrouve donc inséré entre les séquences pré-pro du facteur MF α 1 et le terminateur de transcription; cette construction doit donc assurer la maturation et la sécrétion de l'héliomicine.

Exemple II-3 : Transformation d'une souche de *S. cerevisiae* par l'ADN du plasmide pSEA2 et analyse des transformants.

La souche de levure TGY 48.1 (MATa, ura3-D5, his, pral, prb1, prc1, cps1 ; Reichhart *et al.*, 1992, Invert. Reprod. Dev. 21, pp 15-24) a été transformée par le plasmide pSEA2. Les transformants ont été sélectionnés à 29°C sur un milieu sélectif YNBG (0,67% yeast nitrogen base, 2% glucose), supplémenté avec 0,5 % de casamino acides et ne contenant pas d'uracile. Après transformation, plusieurs clones de levures, sélectionnés pour le caractère ura+, ont été mis en culture pendant 48 h à 29°C dans 50 ml de milieu sélectif. Après centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C), le surnageant a été acidifié jusqu'à pH 3,5 avec de l'acide acétique, avant d'être déposé sur une cartouche Sep-Pak™ C₁₈ (Waters Associates) équilibrée avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les différentes protéines fixées sur la cartouche ont été éluées par des solutions de TFA 0,05% contenant des pourcentages croissants d'acétonitrile.

La fraction 40 %, présentant une activité antifongique, a été analysée en HPLC sur une colonne analytique de phase inverse Aquapore RP-300 C₈ (Brownlee™, 220 x 4,6 mm, 300 Å), en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile de 2% à 40% en 80 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 0,8 ml/min. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm et 254 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antifongique dans les conditions décrites dans l'exemple III. La caractérisation structurale du peptide a été réalisée comme décrit dans l'exemple I.2.

Exemple II-4 : Production d'héliomicine recombinante à l'échelle semi-préparative.

Un des clones de levure transformée exprimant l'héliomicine a été cultivé à 29°C pendant 24 h dans 100 ml de milieu sélectif. Cette préculture a ensuite été utilisée pour inoculer 4 l de milieu sélectif et la culture a été réalisée pendant 48 h à 29 °C. Les levures ont été éliminées par centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C). Le surnageant a été acidifié jusqu'à pH 3,5 avec de l'acide acétique, soumis à une deuxième centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C) avant d'être déposé sur une colonne ouverte de phase inverse preparative C₁₈ (Waters Associates), 125 Å, 6 g de phase pour 500 ml de surnageant) équilibrée avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les molécules hydrophiles ont été éliminées par un lavage avec de l'eau acidifiée suivie d'un lavage avec une solution d'acétonitrile à 15% préparée dans le TFA 0,05%. L'élution du peptide a été réalisée par une solution d'acétonitrile à 40% préparée dans le TFA 0,05%. La fraction éluée à 40% d'acétonitrile a été lyophilisée puis reconstituée dans de l'eau ultrapure stérile avant d'être soumise à la première étape de purification.

- première étape de purification par HPLC : la fraction prépurifiée contenant l'héliomicine a été reconstituée dans une solution d'acétate d'ammonium à 25 mM, pH 3,4. Cet échantillon a été injecté sur une colonne préparative d'échange de cations Aquapore Cation Exchange (Brownlee™, 250 x 10 mm), en utilisant un gradient linéaire de NaCl de 0% à 100% en 90 min dans l'acétate d'ammonium 25 mM, pH 3,4 avec un débit constant de 2 ml/min. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antifongique dans les conditions décrites ci-dessous.

- deuxième étape de purification par HPLC : l'héliomicine a été purifiée jusqu'à homogénéité par chromatographie sur une colonne de phase inverse semi-préparative Aquapore RP-300 C8 (Brownlee™, 220 x 7 mm, 300 Å), eu utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile de 2% à 40% en 80 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 2 ml/min.

Exemple III : Test d'activité in vitro : mesure de l'activité antifongique par microspectrophotométrie.

Cette méthodologie a été utilisée pour la mise en évidence des molécules antifongiques au cours des différentes étapes de purification, pour la détermination du spectre d'activité du peptide et pour la détermination de la concentration minimale

inhibitrice (CMI) à laquelle le peptide a été actif. La CMI a été exprimée comme un intervalle de concentration [a] - [b] où [a] a été la concentration minimale où l'on observe un début de croissance et [b] la concentration pour laquelle aucune croissance n'a été observée. Des exemples de l'activité spécifique de l'héliomicine, vis-à-vis des champignons filamenteux et des levures, sont donnés dans les tableaux 1 et 2.

Exemple III-1 : Test de détection d'activité contre les champignons filamenteux

L'activité antifongique a été détectée par un test d'inhibition de croissance en milieu liquide. Les spores des champignons à tester ont été mises en suspension dans un milieu de culture de type « Pomme de terre-Glucose ». De préférence, on utilise 12 g de milieu Potato Dextrose Broth (Difco) pour 1 l d'eau déminéralisée. Deux antibiotiques ont été rajoutés au milieu de culture : la tétracycline (concentration finale de 10 µg/ml) et la céfotaxime (100µg/ml). On dépose 10 µl de chaque fraction à analyser dans des plaques de microtitration en présence de 90 µl de milieu de culture contenant les spores (à une concentration finale de 10⁴ spores/ml). L'incubation a été réalisée en chambre humide à 30°C durant 48 heures. La croissance fongique a été observée au microscope photonique après 24 h et quantifiée après 48 heures par mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration..

- champignons filamenteux testés : *Aspergillus fumigatus* (don du Dr H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg) ; *Nectria haematococca*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma viride* (mycothèque de l'Université Catholique de Leuven, Belgique) ; *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum*, (mycothèque de la Société Clause, Paris).

Les résultats du test d'activité de l'héliomicine contre les champignons filamenteux sont reportés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : activité de l'héliomicine contre les champignons filamenteux

Champignons	CMI de l'héliomicine (µM)
<i>Neurospora crassa</i>	0,1-0,2
<i>Fusarium culmorum</i>	0,2-0,4
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,5-3
<i>Nectria haematococca</i>	0,4-0,8
<i>Trichoderma viride</i>	1,5-3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6-12,5

Exemple III-2 : Test de détection d'activité contre les levures

Les différentes souches de levure ont été mises en incubation dans un milieu de culture de type « Sabouraud » et incubée à 30°C pendant 24 h sous agitation lente. L'échantillon à tester (10 µl) a été déposé dans des puits de plaque de microtitration dans
 5 lesquels ont été ajoutés 90 µl d'une culture diluée de levure dont la densité a été ajustée à DO 600 = 0,001. On évalue la croissance par la mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration.

-levures testées : *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryp. albidus*, *Saccharomyces cerevisiae* (don du
 10 Dr H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg)

Les résultats du test d'activité de l'héliomicine contre les levures sont reportés dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : activité de l'héliomicine contre les levures.

Levures	CMI de l'héliomicine (µM)
<i>Candida albicans</i>	2,5-5
<i>Candida tropicalis</i>	2,5-5
<i>Candida krusei</i>	10-20
<i>Candida inconspicua</i>	5-10
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,5-5
<i>Cryptococcus albidus</i>	5-10

15

Ces résultats montrent l'excellente activité antifongique du peptide selon l'invention.

Exemple IV: Préparation d'une plante transformée comprenant un gène codant pour l'héliomicine

20

Cet exemple décrit la préparation de la séquence codant pour l'héliomicine pour son expression dans une cellule végétale, du gène chimère, du vecteur d'intégration et des plantes transformées. Les figures 2 à 6 en annexe décrivent les structures schématiques de certains plasmides préparés pour la construction des gènes chimères. Dans ces figures, les
 25 différents sites de restriction sont marqués en *italiques*.

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standard de

laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques sont notamment décrits dans Ausubel & coll.

Exemple IV-1 : Construction des gènes chimères pour la transformation de plantes

pRPA-MD-P: Création d'un plasmide contenant le signal peptide du gène PR-1 α du tabac.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 7 et Oligo 8 ci-après, sont hybridés à 65 °C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30'.

Oligo 7: 5' GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC
ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA CTCTTCTTCT TTTCC 3'

Oligo 8: 5' TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA
GAAGAGTAGA CACAAGAAGG AAAGATGGAA GC 3'

15

Après hybridation entre l'Oligo 7 et l'Oligo 8, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabricant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *SacII* et *NaeI* et cloné dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les mêmes enzymes de restriction. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour peptide signal du gène PR-1 α du tabac (SEQ ID NO 4).

pRPA-PS-PR1a-hélio: Création d'une séquence codant pour l'héliomicine fusionnée au signal peptide PR-1 α sans région non transcrite en 3'.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires de séquences Oligo 9 et Oligo 10 selon les conditions opératoires décrites pour pRPA-MD-P.

Oligo 9: 5' GATAAGCTTA TCGGTTCTTG CGTGTGGGGT GCTGTGAACT
ACACTTCCGA TTGCAACGGT GAGTGCAAGA GGAGGGGTTA 3'

30

Oligo 10: 5' CCGGATCCGT CGACACGTTC GCCTCGCCGA GCTCTCAAGT
CTCGCACCAG CAGTTCACGT TAGCGAAGGA ACCGCAGTGA

CCACCCTTGT AACCCCTCCT CTTGCACTC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 9 et l'Oligo 10, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard
5 préconisées par le fabricant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. Cet oligonucléotide double brin contenant la partie codante de l'héliomicine (SEQ ID NO 2) est ensuite cloné directement dans le plasmide pRPA-MD-P qui a été digéré avec l'enzyme de restriction *NaeI*. L'orientation correcte du clone obtenu est vérifiée par séquençage. On obtient alors un
10 clone comprenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1 α -héliomicine située entre les sites de restriction *NcoI* à l'extrémité N-terminale et *ScaI*, *SacII* et *BamHI* à l'extrémité C-terminale (SEQ ID NO 3).

pRPA-RD-239: Création d'un vecteur d'expression dans les plantes comprenant la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1 α -héliomicine.

15 Le plasmide pRTL-2 GUS, dérivé du plasmide pUC-19, a été obtenu auprès du Dr. Jim Carrington (Texas A&M University, non décrit). Ce plasmide dont la structure schématique est représentée sur la figure 2, contient le promoteur CaMV 35S dupliqué isolé du virus de la mosaïque du choux fleur (Promoteur CaMV 2x35S; Odell & coll., 1985) qui dirige l'expression d'un ARN contenant séquence non traduite en 5' du virus et
20 du tabac (TEV 5' UTR; Carrington & Freed, 1990), le gène de la β -glucuronidase d' *E. coli* (GUS Jefferson & coll., 1987) suivi du site de polyadenylation de l'ARN 35S de CaMV (CaMV polyA; Odell & coll., 1985).

Le plasmide pRTL-2 GUS est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le grand fragment d'ADN est purifié. Le plasmide pRPA-PS-PR1 α -hélio est
25 digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le petit fragment d'ADN contenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1 α -héliomicine est purifié. Les deux fragments d'ADN purifiés sont ensuite liés ensemble dans une cassette d'expression dans les plantes qui synthétise une protéine de fusion PR-1 α -héliomicine. La structure schématique de cette cassette d'expression est représentée sur la figure 3. « PR-1 α -
30 héliomicine » représente la région codante pour la protéine de fusion PR-1 α -héliomicine de pRPA-RD-239. L'héliomicine est transportée vers la matrice extra-cellulaire de la plante par l'action du peptide signal PR-1 α .

pRPA-RD-195: Création d'un plasmide contenant un site de clonage multiple

modifié.

Le plasmide pRPA-RD-195 est un plasmide dérivé du pUC-19 qui contient un site de clonage multiple modifié. Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 11 et Oligo 12 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

Oligo 11: 5' AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC
GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG
CATGC 3'

Oligo 12: 5' CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT
GCATGCCTGC AGGTCTGACTC TAGAGG 3'

L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite lié dans pUC-19 qui a été préalablement digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* et rendu bouts francs en employant le fragment klenow de l'ADN polymérase 1 de *E. coli*. On obtient un vecteur contenant de multiples sites de clonage pour faciliter l'introduction des cassettes d'expression dans un plasmide vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens*. La structure schématique de ce site de clonage multiple est représentée sur la figure 4.

pRPA-RD-240: Introduction de la cassette d'expression de PR-1 α -héliomicine de pRPA-RD-239 dans pRPA-RD-195.

Le plasmide pRPA-RD-239 est digéré avec l'enzyme de restriction *PstII*. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1 α -héliomicine est purifié. Le fragment purifié est ensuite lié dans pRPA-RD-195 qui a été préalablement digéré avec l'enzyme de restriction *PstII* et déphosphorylé avec la phosphatase intestinale de veau.

pRPA-RD-174: Plasmide dérivé de pRPA-BL-150A (EP 0 508 909) contenant le gène de tolérance au bromoxynil de pRPA-BL-237 (EP 0 508 909).

Le gène de tolérance au bromoxynil est isolé de pRPA-BL-237 par une amplification génique par PCR. Le fragment obtenu est à bouts francs et est cloné dans le site *EcoRI* de pRPA-BL-150A qui a été rendu bouts francs par l'action de la polymérase klenow dans des conditions standard. On obtient un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* qui contient le gène de tolérance au bromoxynil à proximité de sa bordure droite, un gène de tolérance à la kanamycine à proximité de sa bordure gauche et un site de clonage

multiple entre ces deux gènes.

La structure schématique de pRPA-RD-174 est représentée sur la figure 5. Sur cette figure, "nos" représente le site de polyadénylation de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NOS pro" représente le promoteur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NPT II" représente le gène de la néomycine phosphotransphérase du transposon Tn5 de *E. coli* (Rothstein & coll., 1981), "35S pro" représente le promoteur 35S isolé du virus de la mosaïque du chou fleur (Odell & coll., 1985), "BRX" représente le gène de la nitrilase isolé de *K. ozaenae* (Stalker & coll., 1988), "RB" et "LB" représentent respectivement les bordures droite et gauche de la séquence d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

pRPA-RD-184: Addition d'un nouveau site de restriction, unique, dans pRPA-RD-174.

Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 13 et Oligo 14 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

Oligo 13: 5' CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC
CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG
TACCTGGTTC AGG 3'

Oligo 14: 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA
CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTTAAAC TTAATTAAGT
GTGGCCTGAC TGG 3'

L'oligonucléotide double brin hybridé (95 paires de bases) est purifié après séparation sur un gel d'agarose (3 % Nusieve, FMC). Le plasmide pRPA-RD-174 est digéré avec l'enzyme de restriction *XmaI*, et le grand fragment d'ADN est purifié. Les deux fragments d'ADN obtenus sont ensuite liés.

On obtient un plasmide dérivé de pRPA-RD-174 comprenant d'autres sites de restriction entre le gène de tolérance au bromoxynil et le gène de la kanamycine marqueur de sélection.

La structure schématique du plasmide pRPA-RD-184 est représentée sur la figure 6 où les termes "nos", "NPT II", "NOS pro", "35S pro", "BRX gene", "RB" et "LB" ont la

même signification que pour la figure 5.

pRPA-RD-241: Création d'un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction du gène codant pour l'héliomicine dirigée vers la matrice extracellulaire.

5 La plasmide pRPA-RD-240 est digéré avec les enzymes de restriction *SfiII* et *AscI* et le fragment d'ADN contenant le gène de PR-1a-héliomicine est purifié. Le plasmide pRPA-RD-184 est digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-héliomicine est ensuite liée dans pRPA-RD-184. On obtient ainsi un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la séquence
10 codant pour la protéine de fusion PR-1a-héliomicine qui conduit à l'expression de l'héliomicine dans la matrice extracellulaire de la plante.

Exemple IV - 2 Création d'une cassette d'expression promoteur CsVMV - peptide signal PG1 - héliomicine - terminateur Nos

pRPA - NP4 : Création d'un plasmide contenant le peptide signal du gène PG1 de
15 polygalacturonase de maïs (Genbank, accession n° X57627).

Les deux oligonucléotides synthétiques partiellement complémentaires Oligo 13 et Oligo 14 ci-après sont hybridés à 65°C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30 minutes.

Oligo 15 : 5' GGTCTAGAAT GGCCTGCACC AACACGCCA TGAGGGCCCT
20 CTCCTCCTC 3'

Oligo 16 : 5' CCGAATTCGG CGCCGTGCAC GATGCAGAAG AGCACGAGGA
GGAAGAGGGC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 13 et l'Oligo 14, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment Klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard
25 préconisées par le fabricant (New England Biolabs) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *XbaI* et *EcoRI*, puis cloné dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les mêmes enzymes de restriction. On obtient alors un clone contenant la région codant pour les 22 acides aminés du peptide
30 signal du gène PG1, et qui peut être fusionné au cadre de lecture d'autres protéines au niveau du site *SfoI* (SEQ ID NO 15).

pRPA - NP5 : Création d'une séquence codant pour l'héliomicine fusionnée au peptide signal du gène PG1

La région codant pour l'héliomicine a été amplifiée par PCR à partir du clone pRPA - PS - PR1a - hélio (SEQ ID NO 3) avec l'enzyme thermostable Pfu (Stratagene) selon les conditions standard préconisées par le fabricant. Les oligonucléotides synthétiques utilisés pour cette amplification sont :

- 5 Oligo 17: 5' GATAAGCTTA TCGGTTCTG CGTG 3'
Oligo 18: 5' GGCTCGAGTC AAGTCTCGCA CCAGCAGTTC AC 3'

Le produit de PCR a été digéré par l'enzyme de restriction XhoI et cloné dans le vecteur pRPA - NP4 digéré par les enzymes de restriction SfoI et XhoI. Le clone résultant comprend donc la région codant pour le peptide signal du gène PG1 fusionnée dans le même cadre de lecture avec la séquence codant pour l'héliomicine (SEQ ID NO 18).

pRPA - NP6 : Création d'une cassette d'expression de l'héliomicine dans un vecteur de transformation

Le vecteur d'expression et de transformation pILTAB 357 est dérivé du vecteur binaire pBin19. Il contient le promoteur CsVMV (Verdager et al. 1996, Plant Mol. Biol. 15 31, 1129-1139) suivi d'un site multiple de clonage et du terminateur de transcription Nos de la nopaline synthase (Figure X+1). La séquence de ce fragment est indiquée (SEQ ID NO 19).

Le vecteur d'expression de l'héliomicine a été obtenu par insertion du fragment de restriction XbaI-KpnI du vecteur pRPA - NP5 contenant la fusion peptide signal PG1 - héliomicine dans le vecteur pILTAB 357 digéré par ces mêmes enzymes. Le clone 20 résultant comporte donc la cassette d'expression promoteur CsVMV - peptide signal PG1 - héliomicine - terminateur Nos (SEQ ID NO 20).

Exemple IV-3: Préparation de tabacs transformés.

25 3.1- Transformation

Les vecteurs pRPA-RD-241 ou pRPA-NP6 sont introduits dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 ou EHA105 (Hood & coll., 1987) porteuse du cosmide pTVK291 (Komari & coll., 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh & coll. (1985).

30 3.2- Régénération

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30 g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur

des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et régénérées selon la technique des disques foliaires (Horsh & coll., 1985) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30 g/l de saccharose contenant 0,05 mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

10 3.3- Analyse de l'expression de l'héliomicine dans le tabac transgénique

a) Production d'anticorps polyclonaux spécifiques

Des anticorps polyclonaux ont été obtenus par immunisation d'un lapin avec de l'héliomicine native selon les procédures habituelles du Centre de Bioexpérimentation VALBEX (IUT A - Lyon I). Le serum obtenu (15 ml) a alors été immunopurifié sur 15 colonne de Sepharose 4B (Pharmacia ; ref 17-0430-01) couplée à de l'héliomicine de manière à sélectionner spécifiquement les immunoglobulines reconnaissant ce peptide. Ces anticorps ont été finalement élués dans 6 ml de glycine (200mM ; pH3), neutralisés avec 1M Tris pH9,5, dialysés avec 0,5x PBS, et conservés congelés à -20°C jusqu'à utilisation.

b) Immunodétection de l'héliomicine dans le tabac transgénique

20 L'analyse de l'expression de l'héliomicine a été conduite sur 8 plantes transgéniques pour la construction pRPA-NP6, ainsi que sur un contrôle sauvage. Des feuilles bien développées de tabac en serre ont été broyées finement à la température de l'azote liquide, et les protéines extraites pendant 1h à 4°C dans le tampon Tris-HCl 50mM, PVP25 1%, 0,05% TritonX100, pH7,5 à raison de 4ml de tampon par gramme de 25 poids frais. Après centrifugation, la concentration en protéines du surnageant a été déterminée par la méthode de Bradford.

Cinq microgrammes de protéines de chacun des 9 extraits ont été déposées sur membrane de nitrocellulose sous un format « slot-blot », ainsi qu'une quantité de 50 ng d'héliomicine pure qui sert de contrôle positif. La membrane a été incubée pendant 1h 30 dans un tampon de blocage à 1% (Boehringer ; ref 1 921 673) dans du TBS, puis incubée sur la nuit à 4°C avec les anticorps immunopurifiés dirigés contre l'héliomicine dilués au 1/2000 dans le tampon TBS avec 0,05% Tween20. Après lavage (TBS, 0,1 Tween20 et 0,5% de tampon de blocage), la membrane a été incubée pendant 1h à température

ambiante (TBS avec 0,5% tampon de blocage) avec un anticorps de chèvre (dilué au 1/50000) dirigé spécifiquement contre les immunoglobulines de lapin et couplé à la phosphatase alcaline (SIGMA A-3687). Après lavage (TBS, 0,1% Tween20), la détection se fait en ajoutant un substrat de la phosphatase (BioRad ; ref 170-5012), et la révélation est obtenue par radiographie du produit luminescent sur film Amersham (ECL).

Le résultat de cette expérience montre que 4 plantes de tabac transgénique expriment fortement l'héliomicine. Le signal dans les autres plantes transgéniques est faible ou non significatif par rapport au témoin sauvage. Le signal observé pour la meilleure plante est du niveau du contrôle positif (50 ng d'héliomicine), ce qui indique que dans cette plante l'héliomicine représente pondéralement environ 1% des protéines totales.

Exemple V-1 : concentrés émulsionnables

Exemple CE 1 :

15	- matière active	400 g/l
	- dodécylbenzène sulfonate alcalin	24 g/l
	- nonylphénol oxyéthylé à 10 molécules d'oxyde d'éthylène	16 g/l
	- cyclohexanone	200 g/l
20	- solvant aromatique	q.s.p. 1 litre

Exemple CE 2

	- matière active	250 g
	- huile végétale époxydée	25 g
25	- mélange de sulfonate d'alcoylaryle et d'éther de polyglycol et d'alcools gras	100 g
	- diAndhylformamide	50 g
	- xylène	575 g

30 Exemple V-2 : suspension concentrée

Exemple SC 1 :

	- matière active	500 g
	- phosphate de tristyrylphénol polyéthoxylé	50 g
	- alkylphénol polyéthoxylé	50 g
35	- polycarboxylate de sodium	20 g
	- éthylène glycol	50 g
	- huile organopolysiloxanique (antimousse)	1 g
	- polysaccharide	1,5 g

- eau 316,5 g

Exemple V-3 : poudres mouillables (ou poudres à pulvériser) :

Exemple PM 1

	- matière active	50%
5	- alcool gras éthoxylé (agent mouillant)	2,5%
	- phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant)	5%
	- craie (support inerte)	42,5%

Exemple PM 2 :

10	- matière active	10%
	- alcool synthétique oxo de type ramifié, en C13 éthoxylé par 8 à 10 oxyde d'éthylène (agent mouillant)	0,75%
15	- lignosulfonate de calcium neutre (agent dispersant)	12%
	- carbonate de calcium (charge inerte)	q.s.p. 100 %

Exemple PM 3 :

	- matière active	75%
20	- agent mouillant	1,50%
	- agent dispersant	8%
	- carbonate de calcium (charge inerte)	q.s.p. 100%

Exemple PM 4 :

25	- matière active	90%
	- alcool gras éthoxylé (agent mouillant)	4%
	- phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant)	6%

Exemple PM 5 :

30	- matière active	50%
	- mélange de tensio-actifs anioniques et non ioniques (agent mouillant)	2,5%
	- lignosulfonate de sodium (agent dispersant)	5%
	- argile kaolinique (support inerte)	42,5%

35

Exemple V-4 : granulés dispersibles

Exemple GD1

Dans un mélangeur, on mélange 90 % en poids de matière active et 10 % d'urée en perles. Le mélange est ensuite broyé dans un broyeur à broches. On obtient une

poudre que l'on humidifie avec environ 8 % en poids d'eau. La poudre humide est extrudée dans une extrudeuse à rouleau perforé. On obtient un granulé qui est séché, puis concassé et tamisé, de façon à ne garder respectivement que les granules d'une dimension comprise entre 150 et 2000 microns.

5 Exemple GD2

Dans un mélangeur, on mélange les constituants suivants :

	- matière active	75%
	- agent mouillant (alkylnaphtalène sulfonate de sodium)	2%
	- agent dispersant (polynaphtalène sulfonate de sodium)	8%
10	- charge inerte insoluble dans l'eau (kaolin)	15%

Ce mélange est granulé en lit fluide, en présence d'eau, puis séché, concassé et tamisé de manière à obtenir des granules de dimension comprise entre 0,15 et 0,80 mm.

15 **Exemple V-5 : compositions pharmaceutiques**

Exemple A: comprimés

On prépare, selon la technique habituelle, des comprimés dosés à 50 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

	- peptide héliomicine M1	50 mg
20	- amidon	60 mg
	- lactose	50 mg
	- stéarate de magnésium	2 mg

Exemple B: solution injectable

25 On prépare une solution injectable contenant 20 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

	- peptide héliomicine M 2	22,4 mg
	- eau distillée	q.s.p. 2 cm ³

30 **Exemple VI. Stabilité de l'activité de l'héliomicine**

La stabilité d'un peptide antimicrobien vis à vis de protéases de plantes est un facteur essentiel pour l'obtention d'un bon niveau d'expression et donc de résistance à des phytopathogènes dans des plantes transgéniques. Cette stabilité est par exemple un point critique pour un peptide antimicrobien d'insecte tel que la cécropine B (Owens et Heutte, 35 1997, MPMI vol 10, n°4, pp 525-528). Nous avons examiné la stabilité de l'héliomicine et de son activité sur un phytopathogène test (*Botrytis cinerea*) après incubation avec des extraits bruts de 8 plantes cultivées majeures (maïs, blé, orge, colza, soja, tournesol, tomate et tabac).

Les feuilles de ces 8 espèces ont été broyées à basse température (azote liquide) dans un mortier, puis la poudre a été resuspendue dans le même volume d'eau. Après centrifugation (10000g pendant 30 minutes), le surnageant a été récupéré, et la concentration en protéine déterminée. Cette concentration a été ajustée pour les 8 extraits à 1mg/ml par dilution avec de l'eau, puis ces extraits ont été filtrés stérilement (0,2 microns). Cent microlitres de chaque extrait (ainsi que un contrôle avec seulement de l'eau) a alors été ajouté à 50 microlitres d'une solution d'héliomicine (contenant 15 microgrammes, ainsi qu'un contrôle sans peptide) dans de l'eau. Ces mélanges ont été incubés à 30°C, un aliquot de 20 microlitres prélevé après 0 h, 1h, 2h, 4h et 20h, immédiatement congelé jusqu'au test.

Le test d'activité antifongique a été réalisé à 25°C en microplaques en ajoutant chaque aliquot à 80 microlitres d'une suspension fraîche de spores de *Botrytis cinerea* (10000 spores/ml dans une solution de Potato Dextrose Broth (Difco, 12g/l). La lecture visuelle des résultats après 12h et 24h montre qu'il n'y a aucune perte significative d'activité antifongique de l'héliomicine, même pour l'échantillon incubé pendant 20h à 30°C, liée à l'exposition à un extrait brut de maïs, blé, orge, colza, soja, tournesol, tomate ou tabac. Ce résultat indique une très forte stabilité de l'héliomicine vis-à-vis de protéases de plantes, et que l'activité antifongique testée sur *Botrytis cinerea* n'est pas affectée par la présence d'extraits bruts végétaux.

20

Exemple VII : Réalisation de différents mutants héliomicine: simples, doubles, triples et quadruples mutants.

Les mutants ci-après sont préparés selon la méthode décrite en exemple II en remplaçant certains des oligonucléotides 1 à 6 par d'autres oligonucléotides choisis pour introduire les mutations.

- **héliomicine R48**: remplacement de l'acide aminé Glu48 de la séquence ID NO: 1 par un acide aminé basique, en particulier une arginine (Arg48). Par analogie avec la séquence codant pour l'héliomicine de la séquence : SEQ ID NO:1, le codon GAA codant pour Glu est remplacée par le codon AGA codant pour Arg. Les oligonucléotides 19 et 20 sont utilisés en remplacement des oligonucléotides 5 et 6 de l'exemple II.

30

Oligo 19: 5' GATCCTTCGC TAACGTTAAC TGTGGTGTA GAACCTGATA GG
3'

Oligo 20: 5' TCGACCTATC AGGTTCTACA CCAACAGTTA ACGTTAGCGA AG

3'

- **héliomicine L28L29**: remplacement de deux acides aminés basiques Lys et Arg en position 28 et 29 de la séquence ID NO: 1 par deux acides aminés hydrophobes, en particulier deux acides aminés leucines (Leu28 et 29). Par analogie avec la séquence codant pour l'héliomicine de la séquence : SEQ ID NO:1, la partie AAG-CGC codant le reste peptidique Lys-Arg est remplacée par la séquence TTG-TTG codant pour le reste peptidique Leu-Leu. Les oligonucléotides 21 et 22 sont utilisés en remplacement des oligonucléotides 3 et 4 de l'exemple II.

Oligo 21: 5' CTAGTGACTG CAACGGCGAG TGCTTGTTGC GC 3'

10 Oligo 22: 5' GCAACAAGCA CTCGCCGTTG CAGTCA 3'

- **héliomicine L28L29R48**: remplacement des deux acides aminés basiques Lys et Arg en position 28 et 29 de la séquence ID NO: 1 par deux résidus acides aminés leucines et remplacement de l'acide aminé Glu48 de la séquence ID NO: 1 par l'acide aminé arginine (Arg48). Les oligonucléotides 19 à 22 sont employés en remplacement des oligonucléotides 3 à 6 selon l'exemple II.

- **héliomicine A24A25**: remplacement des deux acides aminés Asn24 et Gly25 de la séquence ID NO: 1 deux acides aminés alanine (Ala24 et Ala25). Par analogie avec la séquence codant pour l'héliomicine de la séquence ID NO:1, la partie AAC-GGC codant le reste peptidique Asn-Gly est remplacée par la séquence GCT-GCT codant pour Ala-Ala. Les oligonucléotides 23 et 24 sont utilisés en remplacement des oligonucléotides 3 et 4 de l'exemple II.

Oligo 23: 5' CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCAAGCGGC GC 3'

Oligo 24: 5' GCCGCTTGCA CTCAGCAGCG CAGTCA 3'

- **héliomicine A6A7A8A9**: remplacement des acides aminés Asp6-Lys7-Leu8-Ile9 de la séquence ID NO: 1 par 4 acides aminés alanine (Ala). Par analogie avec la séquence codant pour l'héliomicine de la séquence ID NO:1, la partie GAC-AAG-TTG-ATT codant le reste peptidique Asp-Lys-Leu-Ile est remplacée par la séquence GCT-GCT-GCT-GCT codant pour le reste peptidique Ala-Ala-Ala-Ala. Les oligonucléotides 25 et 26 sont utilisés en remplacement de l'oligonucléotide 1 de l'exemple II et les oligonucléotides 27 et 28 en remplacement de l'oligonucléotide 2..

Oligo25: 5' AGCTTGGATA AAAGAGCTGC TGCTGCTGGT AGCTGTGTTT 3'

Oligo 26: 5' GGGGCGCCG TCAACTACA 3'

Oligo 27: 5' CTAGTG TAGT TGACGGCGCC CC 3'

Oligo 28: 5' AAACACAGCT ACCAGCAGCA GCAGCTCTTT TATCCA 3'

- héliomicine A24A25L28L29: Deux oligonucléotides (sens et antisens) ont été nécessaires pour palier à l'absence d'un site de restriction entre la séquence codant pour le reste peptidique constitué des deux acides aminés Asn24-Gly25 et la séquence codant pour le reste peptidique constitué des deux acides aminés Lys28-Arg29 de l'héliomicine de la séquence ID NO: 1. Les deux séquences oligonucléotidiques 29 et 30 remplacent respectivement les deux séquences oligonucléotidiques 3 et 4 de l'exemple II.

Oligo 29: 5' CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCTTGTTGC GC 3'

Oligo 30: 5' GCAACAAGCA CTCAGCAGCG CAGTCA 3'

10 Production d'héliomicine mutée à l'échelle semi-préparative.

Les différents mutants d'héliomicine sont préparés et purifiés de la façon suivante. Un des clones de levure transformée exprimant l'héliomicine mutée a été cultivé à 29°C pendant 48 h dans 50 ml de milieu sélectif. Cette préculture a ensuite été utilisée pour inoculer 2 l de milieu sélectif et la culture a été réalisée pendant 48 h à 29 °C. Les levures ont été éliminées par centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C). Le surnageant a été acidifié jusqu'à pH 3,5 avec de l'acide acétique, soumis à une deuxième centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C) avant une première étape d'extraction en phase solide.

- première étape d'extraction en phase solide sur un gel de phase inverse : le surnageant acidifié est déposé sur une cartouche Sep-Pak Vac 35cc de phase inverse C18 (Waters Associates, 10 g de phase) équilibrée avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les molécules hydrophiles ont été éliminées par un lavage avec de l'eau acidifiée suivie d'un lavage avec une solution d'acétonitrile à 15% préparée dans le TFA 0,05%. L'élution du peptide a été réalisée par une solution d'acétonitrile à 60% préparée dans le TFA 0,05%. La fraction éluée à 60% d'acétonitrile a été lyophilisée puis reconstituée dans de l'eau ultrapure stérile avant d'être soumise à la première étape de purification.

- deuxième étape d'extraction en phase solide sur un gel échangeur de cations : la fraction 60% prépurifiée contenant l'héliomicine mutée a été reconstituée dans une solution d'acétate d'ammonium à 25 mM, pH 3,4. Cet échantillon a été déposée sur une cartouche Sep-Pak Vac 35cc CM échangeuse de cations (Waters Associates, 10 g de phase) équilibrée avec de l'acétate d'ammonium à 25 mM, pH 3,4. L'héliomicine mutée est éluée en utilisant une solution à 1 M de chlorure de sodium (NaCl) préparée dans l'acétate d'ammonium à 25 mM, pH 3,4. La fraction 1 M NaCl contenant l'héliomicine mutée est recueillie, asséchée sous vide, reconstituée avec 20 ml d'eau ultrapure acidifiée

(TFA 1%). L'héliomicine mutée est alors purifiée par HPLC de phase inverse.

- dernière étape de purification par HPLC : l'héliomicine mutée a été purifiée jusqu'à homogénéité par chromatographie sur une colonne de phase inverse préparative Aquapore RP-300 C8 (Brownlee™, 220 x 10 mm, 300 Å), en utilisant un gradient linéaire diphasique d'acétonitrile de 2% à 23% en 10 min et de 23% à 33% en 80 min dans le TFA 0,05% au débit constant de 2,5 ml/min. La fraction recueillie est asséchée sous vide, reconstituée avec de l'eau ultrapure et analysée par spectrométrie de masse MALDI pour en vérifier la pureté et l'identité. Les différentes héliomicines mutées ont été analysées pour leur activité antifongique dans les conditions décrites pour l'héliomicine de référence contre les souches suivantes : *Neurospora crassa*, *Fusarium culmorum* et *Nectria haematococca*. L'activité des mutants d'héliomicine a également été évaluée contre des bactéries. Les conditions expérimentales utilisées sont décrites ci-dessous.

Test d'activité in vitro : mesure de l'activité antibactérienne et antifongique par microspectrophotométrie.

Cette méthodologie a été utilisée pour la détermination du spectre d'activité du peptide et de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à laquelle le peptide muté est actif. La CMI a été exprimée comme un intervalle de concentration [a] - [b] où [a] a été la concentration minimale où l'on observe un début de croissance et [b] la concentration pour laquelle aucune croissance n'a été observée. Des exemples de l'activité spécifique de l'héliomicine mutée, vis-à-vis des bactéries et champignons filamenteux sont donnés dans le tableau 3.

L'activité antibactérienne a été détectée par un test d'inhibition de croissance en milieu liquide. Les bactéries à tester ont été mises en suspension dans un milieu nutritif de type " Poor Broth ". De préférence, on utilise une solution de bactotryptone à 1% additionnée de NaCl à 1% en poids/volume préparée dans de l'eau déminéralisée. On dépose 10 µl de chaque fraction à analyser dans des plaques de microtitration en présence de 90 µl de milieu de culture contenant les bactéries (à une concentration finale équivalente à 1mDO à 600 nm). L'incubation a été réalisée à 25°C durant 12 à 24 heures. La croissance bactérienne a été mesurée en suivant l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration.

- bactéries testées : *Bacillus megaterium* (collection de Institut Pasteur), *Micrococcus luteus* (collection de l'Institut Pasteur), *Staphylococcus aureus* (H. Monteil, Institut de bactériologie, Strasbourg), *Aerococcus viridans* (H. Monteil, Institut de

bactériologie, Strasbourg), et *Escherichia coli* D22 (P. L. Boquet, Centre d'Etudes Nucléaires, Saclay).

Tableau 3 : activité de certaines héliomicines mutées contre les champignons filamenteux et les bactéries

5	Micro-organismes	CMI des mutants d'héliomicine (µM)				
		L28L29	R48	L28L29R48	A6A7A8A9	Hélio
	Champignons					
	<i>Neurospora crassa</i>	0,8-1,6	0,4-0,8	0,8-1,6	1,6-3,1	0,1-0,2
	<i>Fusarium culmorum</i>	3,1-6,2	0,4-0,8	0,8-1,6	3,1-6,2	0,2-0,4
10	<i>Nectria haematococca</i>	3,1-6,2	0,4-0,8	0,8-1,6	ND	0,4-0,8
	Bactéries					
	<i>Bacillus megaterium</i>	50-100	ND	ND	6,2-12,5	ND
	<i>Micrococcus luteus</i>	12,5-25	25-50	ND	ND	ND
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	ND	ND
15	<i>Aerococcus viridans</i>	ND	ND	ND	12,5-25	ND
	<i>Escherichia coli</i> D22	ND	ND	ND	ND	ND

ND: pas d'activité détectée.

Exemple VIII : Etude de toxicité aiguë

- 20 Des groupes de 4 souris femelles ont été traitées par injection intraveineuse de solutions d'héliomicine (SEQ ID NO 2) en solution saline à des doses de 1 et 10 mg/kg. Des solutions correspondantes d'aprotinine comme contrôle négatif (pas d'effets pour les deux doses) et de mellitine comme contrôle positif (100% de mortalité à 5 jours à 10 mg, effets significatifs à 5 jours à 1mg). Aucune toxicité n'a été mise en évidence pour les
- 25 solutions d'héliomicine aux deux doses injectées.

REFERENCES

- Ausubel, F. A. & coll. (eds. Greene). Current Protocols in Molecular Biology. Publ. Wiley & Sons.
- 30 Bevan, M. & coll. (1983). Nuc. Acids Res. **11**:369-385.
- Carrington and Freed (1990). J. Virol. **64**:1590-1597.

- Ehret-Sabatier & coll. (1996) *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 47, 29537-29544.
- Horsch & coll. (1985). *Science* **227**:1229-1231.
- Jefferson & coll. (1987). *EMBO J.* **6**:3901-3907.
- Komari & coll. (1986). *J. Bacteriol.* **166**:88-94.
- 5 Rothstein & coll. (1981). *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **45**: 99-105.
- Stalker & coll. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**:6310-6314.
- Odell, J.T. & coll. (1985). *Nature* **313**:810-812.

REVENDICATIONS

1. Peptide comprenant essentiellement la séquence peptidique de formule (I),
Xaa-Cys-Xab-Cys-Xac-Cys-Xad-Cys-Xae-Cys-Xaf-Cys-Xag

5

(I)

dans laquelle:

Xaa est -NH₂ ou un reste peptidique comprenant de 1 à 10 acides aminés, de préférence de 1 à 6 acides aminés,

10

Xab est un reste peptidique comprenant de 1 à 10 acides aminés, de préférence 10,

Xac est un reste peptidique comprenant de 3 acides aminés,

Xad est un reste peptidique comprenant de 1 à 9 acides aminés, de préférence 9,

Xae est un reste peptidique comprenant de 1 à 7 acides aminés, de préférence 7,

Xaf est un reste peptidique de 1 acide aminé, et

15

Xag est -OH ou un reste peptidique comprenant de 1 à 5 acides aminés, de préférence 1 ou 2 acides aminés.

2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que
Xaa comprend au moins un acide aminé basique, et/ou
Xad comprend au moins un acide aminé basique.

20

3. Peptide selon la revendication 2, caractérisé en ce que Xad comprend 1, 2, 3 ou 4 acides aminés basiques.

4. Peptide selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que les acides aminés basiques sont choisis parmi la lysine, l'arginine ou l'homoarginine.

25

5. Peptide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que
Xad représente la séquence peptidique suivante -Lys-Xad'-Xad"-Gly-His-, dans laquelle
Xad' représente un reste peptidique de 1 acide aminé basique et Xad" représente un reste
peptidique comprenant de 0 à 5 acides aminés, de préférence 5.

6. Peptide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que Xad
représente la séquence peptidique suivante -Lys-Arg-Arg-Gly-Tyr-Lys-Gly-Gly-His-.

30

7. Peptide selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que Xac
comprend au moins un acide aminé acide, de préférence 1.

8. Peptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que
Xac représente la séquence peptidique suivante -Asn-Xac'-Xac"-, dans laquelle Xac'
représente un reste peptidique de 1 acide aminé, et Xac" représente un reste peptidique de

1 acide aminé acide.

9. Peptide selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que les acides aminés acides sont choisis parmi l'acide glutamique (Glu) ou l'acide aspartique (Asp).

5 10. Peptide selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que Xac représente la séquence peptidique suivante -Asn-Gly-Glu-.

11. Peptide selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que Xaa représente la séquence peptidique suivante Xaa'-Gly-Xaa''- dans laquelle Xaa' représente NH₂ ou un reste peptidique comprenant 1 à 9 acides aminés, de préférence 1 à 10 5 acides aminés, et Xaa'' représente un reste peptidique comprenant au moins un acide aminé, choisi de préférence parmi Leu, Ile, Val, Pro, Ser ou Thr, et/ou Xab représente la séquence peptidique suivante -Val-Xab'-Asp-, dans laquelle Xab' représente un reste peptidique comprenant de 0 à 8 acides aminés, de préférence 8, et/ou Xae représente la séquence peptidique suivante -Gly-Xae'-Asn-, dans laquelle Xae' 15 représente un reste peptidique comprenant de 0 à 5 acides aminés, de préférence 5, et/ou Xaf représente l'un des acides aminés suivants Trp, Phe, Leu, Ile ou Val, et/ou Xag représente la séquence peptidique suivante -Glu-Xag' dans laquelle Xag' représente OH ou un reste variable de séquence comprenant de 1 à 4 acides aminés, de préférence 1 acide aminé.

12. Peptide selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que Xaa représente la séquence peptidique suivante NH₂-Asp-Lys-Leu-Ile-Gly-Ser-, et/ou Xab représente la séquence peptidique suivante -Val-Trp-Gly-Ala-Val-Asn-Tyr-Thr-Ser-Asp-, et/ou Xae représente la séquence peptidique suivante -Gly-Ser-Phe-Ala-Asn-Val-Asn-, et/ou 25 Xaf représente l'acide aminé suivant -Trp-, et/ou Xag représente la séquence peptidique suivante -Glu-Thr-OH.

13. Peptide selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il est représenté par l'identificateur de n° 2 (SEQ ID NO 2).

14. Peptide selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il 30 comprend à l'une ou l'autre de leurs extrémités, ou les deux, des résidus peptidiques nécessaires à son expression et ciblage dans un organisme hôte.

15. Peptide selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que les résidus cystéines du peptide de formule (I) forment au moins un pont disulfure

intramoléculaire.

16. Peptide selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend 3 ponts disulfures établis entre les résidus cystéine 1 et 4, 2 et 5 et 3 et 6.

17. Peptide de fusion « peptide-héliomicine », caractérisé en ce que
5 l'héliomicine est un peptide défini selon l'une des revendications 1 à 16.

18. Peptide de fusion selon la revendication 17, caractérisé en ce que le peptide fusionné à l'héliomicine est un peptide signal ou un peptide de transit.

19. Peptide de fusion selon la revendication 18, caractérisé en ce que le peptide de transit est le peptide signal du gène PR-1 α du tabac ou le précurseur du facteur Mat
10 alpha 1 ou le peptide signal du gène PG1 de polygalacturonase de maïs.

20. Peptide de fusion selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il est représenté par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID No 3), ou par l'identificateur de séquence n° 18 (SEQ ID NO 18).

21. A titre de médicament, le peptide selon l'une des revendications 1 à 20.

15 22. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend le peptide selon l'une des revendications 1 à 20 et un véhicule approprié.

23. Fragment d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour un peptide selon l'une des revendications 1 à 20.

20 24. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une séquence nucléotidique de type ADN.

25 25. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 24, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique de type ADN comprend la séquence d'ADN décrite par les bases 16 à 147 de l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2), par les bases 3 à 224 de l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3), ou par les bases 7 à 205 de l'identificateur de séquence n° 18 (SEQ ID NO 18), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

30 26. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les plantes, caractérisé en ce que la séquence codante comprend au moins un fragment d'ADN tel que défini dans les revendications 23 à 25.

27. Gène chimère selon la revendication 26, caractérisé en ce que l'organisme hôte est un microorganisme.

28. Gène chimère selon la revendication 26, caractérisé en ce que l'organisme

hôte est choisi parmi les cellules végétales et les plantes.

29. Vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte caractérisé en ce qu'il comprend au moins une origine de réplication et au moins un gène chimère tel que défini dans les revendications 26 à 28.

5 30. Organismes hôtes transformés, caractérisés en ce qu'ils contiennent un fragment d'acide nucléique selon les revendications 23 à 25, ou un gène chimère selon les revendications 26 à 28.

31. Organisme hôte transformé selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'il s'agit de micro organismes, de cellules végétales ou de plantes.

10 32. Organisme hôte transformé selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une plante contenant des cellules transformées.

33. Organisme hôte selon la revendication 32, caractérisé en ce que la plante est régénérée à partir des cellules transformées.

15 34. Organisme hôte transformé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le microorganisme est choisi parmi les bactéries, en particulier *E. coli*, les levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, les champignons, en particulier *Aspergillus*, ou les bacilovirus,

20 35. Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle contient un fragment d'acide nucléique selon les revendications 23 à 25 ou un gène chimère selon les revendications 26 à 28.

36. Plante transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cellule végétale transformée selon la revendication 35.

25 37. Plante transformée selon la revendication 36, caractérisée en ce qu'elle est résistante aux maladies causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.

38. Plante transformée, caractérisée en ce qu'elle est issue de la culture et/ou du croisement des plantes selon l'une des revendications 36 ou 37.

30 39. Graines de plantes transformées selon l'une des revendications 36 à 38.

40. Procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales ou des plantes, caractérisé en ce que l'on insère dans ledit organisme hôte au moins un fragment d'acide nucléique selon les revendications 23 à 25 ou un gène chimère

selon l'une des revendication 26 à 28.

41. Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce que l'organisme hôte est une cellule végétale ou une plante.

42. Procédé selon la revendication 41, caractérisé en ce que l'on régénère une
5 plante à partir de la cellule végétale ou de la plante transformée.

43 Procédé de culture des plantes transformées selon l'une des revendications 36 à 38, caractérisé en ce qu'il consiste à planter les graines des dites plantes transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une composition agrochimique, sans affecter de manière
10 substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

44. Procédé de culture selon la revendication 33, caractérisé en ce que la composition agrochimique comprend au moins un produit actif ayant au moins une
15 activité fongicide et/ou bactéricide.

45. Procédé de culture selon la revendication 44, caractérisé en ce que le produit actif présente une activité complémentaire de celle du peptide selon l'une des revendications 1 à 20.

46. Procédé de préparation d'héliomicine définie selon l'une des revendications
20 1 à 20, caractérisé en ce qu'il comprend comprenant les étapes de culture d'un organisme transformé selon l'une des revendications 30 à 34 dans un milieu de culture approprié, puis l'extraction et la purification totale ou partielle de l'héliomicine obtenue.





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

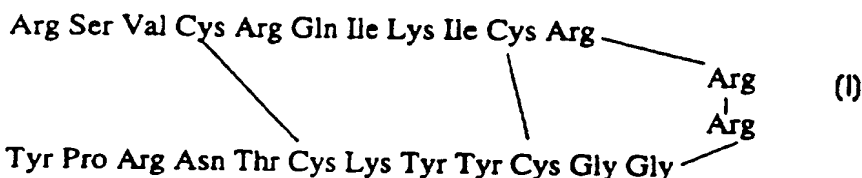
(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/435, A01N 63/02, A61K 38/17		A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/30082
			(43) Date de publication internationale: 21 août 1997 (21.08.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00295		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 17 février 1997 (17.02.97)		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 96/02168 16 février 1996 (16.02.96) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BULET, Philippe [FR/FR]; 11, rue du Cottage, F-67550 Vendenheim (FR). HETRU, Charles [FR/FR]; 5, rue des Moineaux, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR). SABATIER, Laurence [FR/FR]; 8, rue des Vergers, F-67120 Molsheim (FR).			
(74) Mandataire: CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie - D.P.I., 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).			
(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 25 septembre 1997 (25.09.97)			

(54) Title: ANTIFUNGIC AND ANTIBACTERIAL PEPTIDE

(54) Titre: PEPTIDE ANTIBACTERIEN ET ANTIFONGIQUE

(57) Abstract

The invention discloses an antibacterial and antifungic peptide having the formula (I).



(57) Abrégé

Peptide antibactérien et antifongique de la formule (I), utilisable comme antibactérien et antifongique.



1/2

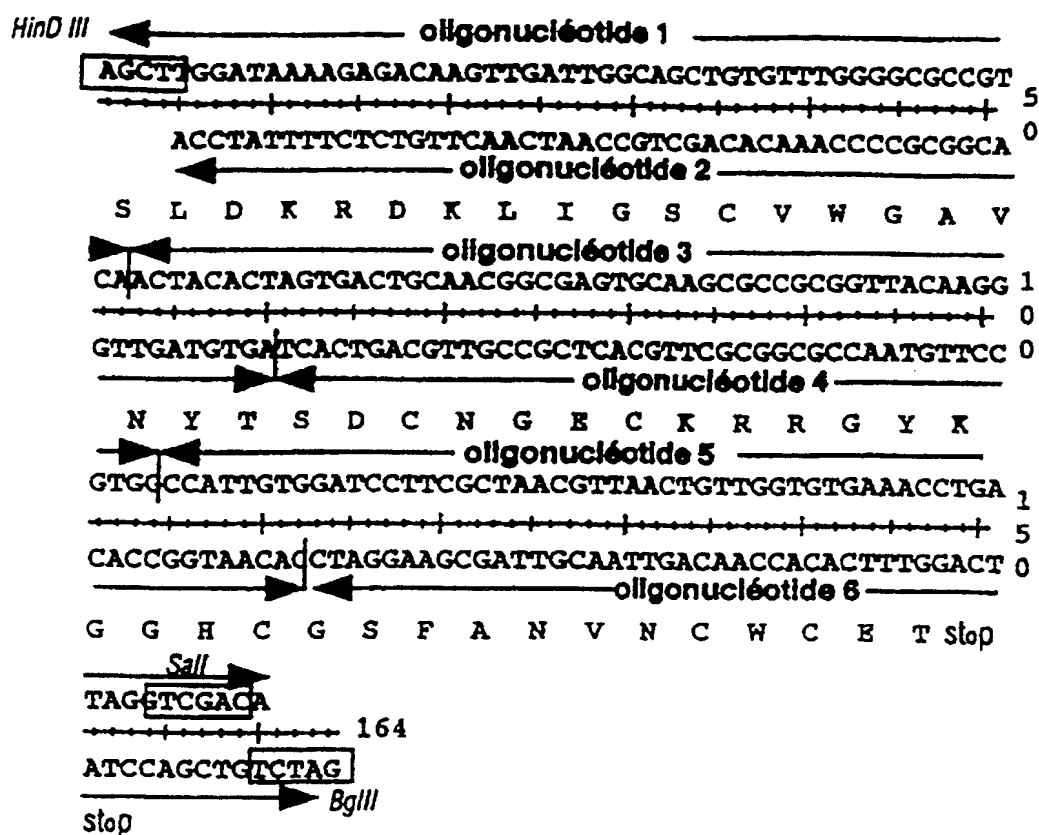


Fig. 1

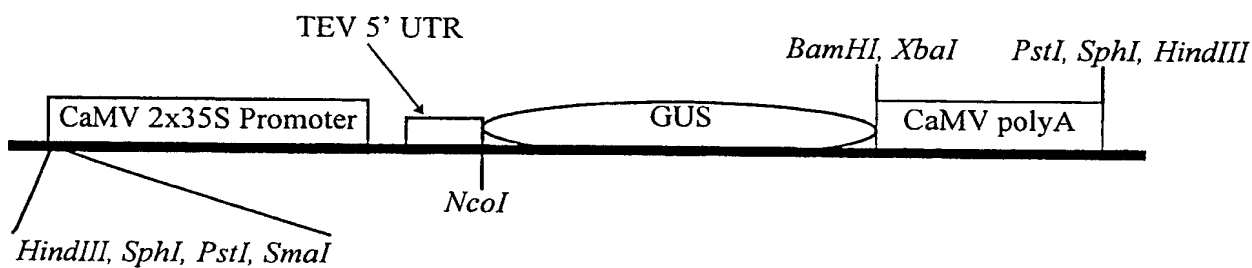


Fig. 2



2/2

5

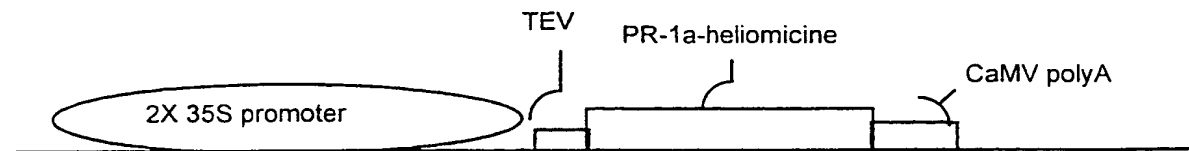


Fig. 3

10

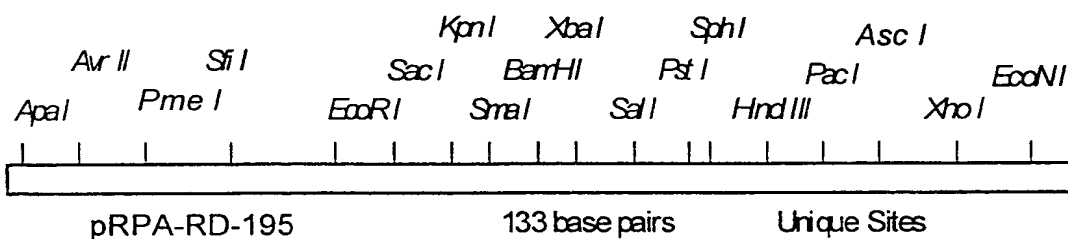


Fig. 4

15

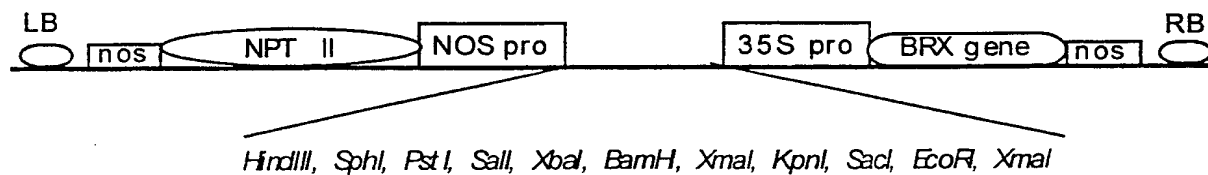


Fig. 5

20

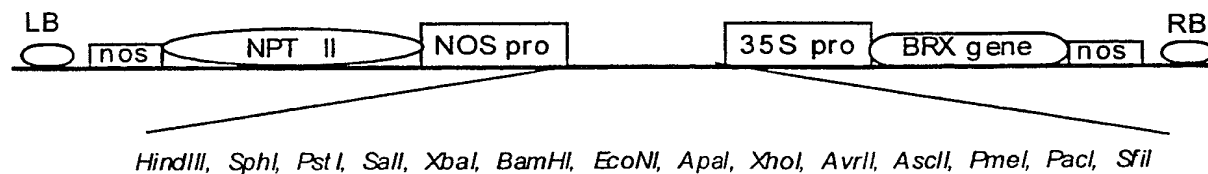


Fig. 6

25



LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC AGROCHIMIE
- (B) RUE: 14-20 Rue Pierre BAIZET
- (C) VILLE: LYON
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69009

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Gène codant pour l'héliomicine, protéine obtenue, vecteur le contenant, organismes transformés obtenus et procédé de préparation

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 38

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 147 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1..147

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGC TTG GAT AAA AGA GAC AAG TTG ATT GGC AGC TGT GTT TGG GGC GCC	48
Ser Leu Asp Lys Arg Asp Lys Leu Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala	
1 5 10 15	
GTC AAC TAC ACT AGT GAC TGC AAC GGC GAG TGC AAG CGC CGC GGT TAC	96
Val Asn Tyr Thr Ser Asp Cys Asn Gly Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr	
20 25 30	
AAG GGT GGC CAT TGT GGA TCC TTC GCT AAC GTT AAC TGT TGG TGT GAA	144
Lys Gly Gly His Cys Gly Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu	
35 40 45	
ACC	147
Thr	
49	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 169 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1..132

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GAT AAG CTT ATC GGT TCC TGC GTG TGG GGT GCT GTG AAC TAC ACT TCC	48
Asp Lys Leu Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala Val Asn Tyr Thr Ser	
1 5 10 15	
GAT TGC AAC GGT GAG TGC AAG AGG AGG GGT TAC AAG GGT GGT CAC TGC	96
Asp Cys Asn Gly Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys	
20 25 30	
GGT TCC TTC GCT AAC GTG AAC TGC TGG TGC GAG ACT TGAGAGCTCG	142
Gly Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu Thr	
35 40	
GCGAGGCGAA CGTGTCGACG GATCCGG	169

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 261 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 3..224

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CC ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT CTT GTG	47
Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu Leu Val	
1 5 10 15	
TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT GCC GAT	95
Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg Ala Asp	
20 25 30	
AAG CTT ATC GGT TCC TGC GTG TGG GGT GCT GTG AAC TAC ACT TCC GAT	143
Lys Leu Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala Val Asn Tyr Thr Ser Asp	
35 40 45	

TGC AAC GGT GAG TGC AAG AGG AGG GGT TAC AAG GGT GGT CAC TGC GGT 191
 Cys Asn Gly Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys Gly
 50 55 60

TCC TTC GCT AAC GTG AAC TGC TGG TGC GAG ACT TGAGAGCTCG GCGAGGCGAA 244
 Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu Thr
 65 70

CGTGTCGACG GATCCGG 261

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 120 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 12..101

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CGGTCGACGC G ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT 50
 Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu
 1 5 10

CTT GTG TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT 98
 Leu Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg
 15 20 25

GCT GGAGACGCGA ATTCACACA 129
 Ala
 30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 75 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 7"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CGGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA 60
 CTCTTCTTCT TTTCC 75



(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 72 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 8"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA GAAGAGTAGA CACAAGAAGG 60
AAAGATGGAA GC 72

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 80 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 9"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GATAAGCTTA TCGGTTCTTG CGTGTGGGGT GCTGTGAACT ACACTTCCGA TTGCAACGGT 60
GAGTGCAAGA GGAGGGGTTA 80

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 109 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 10"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CCGGATCCGT CGACACGTTT GCCTCGCCGA GCTCTCAAGT CTCGCACCAG CAGTTCACGT 60
TAGCGAAGGA ACCGCAGTGA CCACCCTTGT AACCCCTCCT CTTGCACTC 109

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 85 paires de bases



1.2



- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 11"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGGATC 60

CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGC 85

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 66 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 12"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC 60

TAGAGG 66

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 13"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT 60

GCTCGAGGGC CCAACCTCAG TACCTGGTTC AGG 93

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 14"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA CACCTAGGCG CGCCGGGGCC 60
GCGTTTAAAC TTAATTAAGT GTGGCCTGAC TGG 93

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 50 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 15"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GGTCTAGAAT GGCCTGCACC AACAAACGCCA TGAGGGCCCT CTCCTCCTC 50

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 50 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 16"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

CCGAATTCGG CGCCGTGCAC GATGCAGAAG AGCACGAGGA GGAAGAGGGC 50

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO:15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 81 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMLACEMENT: 7...73

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:15:



TCTAGA ATG GCC TGC ACC AAC AAC GCC ATG AGG GCC CTC TTC CTC CTC
Met Ala Cys Thr Asn Asn Ala Met Arg Ala Leu Phe Cys Ile
1 5 10

48

CTG CTC TTC TGC ATC GTG CAC GGC GCCGAATTC
Val Leu Phe Cys Ile Val His Gly
15 20

81

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 17"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

GATAAGCTTA TCGGTTCTG CGTG

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 18"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

GGCTCGAGTC AAGTCTCGCA CCAGCAGTTC AC

32

2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 213 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 7...205

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO:18:

TCTAGA ATG GCC TGC ACC AAC AAC GCC ATG AGG GCC CTC TTC CTC CTC

48

Met	Ala	Cys	Thr	Asn	Asn	Ala	Met	Arg	Ala	Leu	Phe	Cys	Ile			
1				5				10								
CTG	CTC	TTC	TGC	ATC	GTG	CAC	GGC	GAT	AAG	CTT	ATC	GGT	TCC	TGC	GTG	96
Val	Leu	Phe	Cys	Ile	Val	His	Gly	Asp	Lys	Leu	Ile	Gly	Ser	Cys	Val	
15				20				25					30			
TGG	GGT	GCT	GTG	AAC	TAC	ACT	TCC	GAT	TGC	AAC	GGT	GAG	TGC	AAG	AGG	144
Trp	Gly	Ala	Val	Asn	Tyr	Thr	Ser	Asp	Cys	Asn	Gly	Glu	Cys	Lys	Arg	
				35				40					45			
AGG	GGT	TAC	AAG	GGT	GGT	CAC	TGC	GGT	TCC	TTC	GCT	AAC	GTG	AAC	TGC	192
Arg	Gly	Tyr	Lys	Gly	Gly	His	Cys	Gly	Ser	Phe	Ala	Asn	Val	Asn	Cys	
			50				55					60				
TGG	TGC	GAG	ACT	TGACTCGAG												213
Trp	Cys	Glu	Thr													
			65													

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 838 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: promoteur CsVMV
- (B) EMPLACEMENT: 7..532

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: site de clonage multiple
- (B) EMPLACEMENT: 533..568

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: terminateur
- (B) EMPLACEMENT: 569..832

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AAGCTTCCAG	AAGGTAATTA	TCCAAGATGT	AGCATCAAGA	ATCCAATGTT	TACGGGAAAA	60
ACTATGGAAG	TATTATGTGA	GCTCAGCAAG	AAGCAGATCA	ATATGCGGCA	CATATGCAAC	120
CTATGTTCAA	AAATGAAGAA	TGTACAGATA	CAAGATCCTA	TACTGCCAGA	ATACGAAGAA	180
GAATACGTAG	AAATTGAAAA	AGAAGAACCA	GGCGAAGAAA	AGAATCTTGA	AGACGTAAGC	240
ACTGACGACA	ACAATGAAAA	GAAGAAGATA	AGGTCGGTGA	TTGTGAAAGA	GACATAGAGG	300
ACACATGTAA	GGTGAAAAAT	GTAAGGGCGG	AAAGTAACCT	TATCACAAAG	GAATCTTATC	360
CCCCACTACT	TATCCTTTTA	TATTTTTC	CGTGTCATTTT	TGTCATTTT	GCCCTTGAGT	420



AAGGAACCAA GTTCGGCATT TGTGAAAACA AGAAAAAATT TGGTGTAAGC TATTTTCTTT	480
GAAGTACTGA GGATACAAC TCAGAGAAAT TTGTAAGTTT GTAGATCTCG ATTCTAGAAG	540
GCCTGAATTC GAGCTCGGTA CCGGATCCAA TTCCCGATCG TTCAAACATT TGGCAATAAA	600
GTTTCTTAAG ATTGAATCCT GTTGCCGGTC TTGCGATGAT TATCATATAA TTTCTGTTGA	660
ATTACGTAA GCATGTAATA ATTAACATGT AATGCATGAC GTTATTTATG AGATGGGTTT	720
TTATGATTAG AGTCCCGCAA TTATACATTT AATACGCGAT AGAAAACAAA ATATAGCGCG	780
CAAAC TAGGA TAAATTATCG CGCGCGGTGT CATCTATGTT ACTAGATCGG GGATCGAT	838

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 1036 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: promoteur CsVMV
 - (B) EMPLACEMENT: 7..532

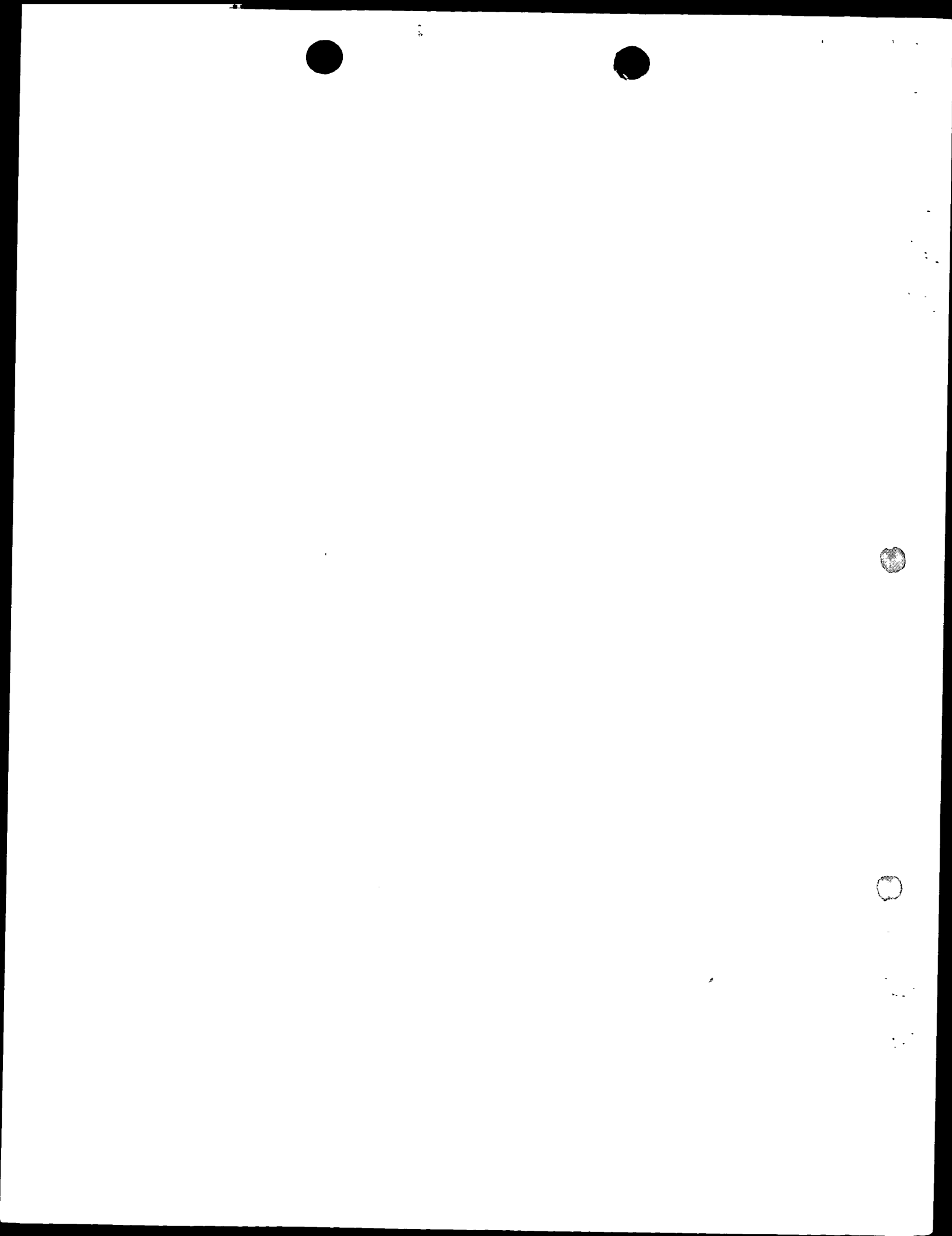
- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMPLACEMENT: 539..736

- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: terminateur nos
 - (B) EMPLACEMENT: 767..1030

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

AAGCTTCCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA	60
ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGCAAC	120
CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA	180
GAATACGTAG AAATTGAAAA AGAAGAACCA GGCGAAGAAA AGAATCTTGA AGACGTAAGC	240
ACTGACGACA ACAATGAAAA GAAGAAGATA AGGTCGGTGA TTGTGAAAGA GACATAGAGG	300
ACACATGTAA GGTGGAAAAT GTAAGGGCGG AAAGTAACCT TATCACAAAG GAATCTTATC	360
CCCCACTACT TATCCTTTTA TATTTTCCG TGTCATTTTT GCCCTTGAGT TTCCTATAT	420
AAGGAACCAA GTTCGGCATT TGTGAAAACA AGAAAAAATT TGGTGTAAGC TATTTTCTTT	480
GAAGTACTGA GGATACAAC TCAGAGAAAT TTGTAAGTTT GTAGATCTCG ATTCTAGA	538

[illegible]



(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

AGTGTAGTTG ACGGCGCCCC AAACACAGCT GCCAATCAAC TTGTCTCTTT TATCCA

56

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 52 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 3"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

ACTACACTAG TGACTGCAAC GGCGAGTGCA AGCGCCGCGG TTACAAGGGT GG

52

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 52 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 4"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

CACAATGGCC ACCCTTGTA CCGCGGCGCT TGCACTCGCC GTTGCA GTCA CT

52

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 56 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 5"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

CCATTGTGGA TCCTTCGCTA ACGTTAACTG TTGGTGTGAA ACCTGATAGG TCGACA

56

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 52 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide



- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 6"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

GATCTGTCTGA CCTATCAGGT TTCACACCAA CAGTTAACGT TAGCGAAGGA TC

52

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 19"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

GATCCTTCGC TAACGTTAAC TGTTGGTGTA GAACCTGATA GG

42

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 20"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

TCGACCTATC AGGTTCTACA CCAACAGTTA ACGTTAGCGA AG

42

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 21"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

CTAGTGACTG CAACGGCGAG TGCTTGTTGC GC

32



(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 22"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

GCAACAAGCA CTCGCCGTTG CAGTCA

26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 23"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCAAGCGGC GC

32

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 24"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

GCCGCTTGCA CTCAGCAGCG CAGTCA

26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 40 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique



(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 25"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

AGCTTGATA AAAGAGCTGC TGCTGCTGGT AGCTGTGTTT

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 26"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

GGGGCGCCGT CAACTACA

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 27"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

CTAGTGTAGT TGACGGCGCC CC

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 28"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

AAACACAGCT ACCAGCAGCA GCAGCTCTTT TATCCA

36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 37:



(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 29"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCTTGTTGC GC

32

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 30"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

GCAACAAGCA CTCAGCAGCG CAGTCA

26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/82 A61K38/17 C12P21/02
C12N15/62 C12N15/81

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 695 392 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11 March 1994 (1994-03-11) page 1, line 33 - page 7, line 2	1-4,8, 11,21, 22,46
Y	---	13,14,25
X	WO 90 11770 A (CALGENE INC) 18 October 1990 (1990-10-18) page 1 - page 19 ---	1-4,8, 11,17, 18, 21-24, 28-46
X	FR 2 725 992 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 26 April 1996 (1996-04-26) cited in the application the whole document --- -/--	1-4,8, 11,21,22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 August 1999

Date of mailing of the international search report

13/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00843

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHUNG K T ET AL: "Antibacterial factors in immune hemolymph from heliothis virescens larvae" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 96, no. 0, 19 May 1996 (1996-05-19), page 275 XP002089180 WASHINGTON US abstract	13,14,25
A	DE 22 12 854 A (WSES0JUSNYJ NAUTSCHNO) 2 November 1972 (1972-11-02) the whole document	1,21,22, 46
A	WO 97 30082 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 21 August 1997 (1997-08-21) the whole document & FR 2 745 004 A cited in the application	1,21,22
A	EP 0 307 841 A (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 22 March 1989 (1989-03-22) the whole document	17,19, 20,23, 25,26, 29,30, 35,36
A	EP 0 607 080 A (TRANSGENE SA) 20 July 1994 (1994-07-20) page 2, line 28 - line 53	17-19
A	HOFFMANN J A ET AL.: "Insect defensins: inducible antibacterial peptides" IMMUNOLOGY TODAY., vol. 13, no. 10, 1992, pages 411-415, XP002089181 CAMBRIDGE GB the whole document	1-46
P,X	LAMBERTY M ET AL.: "Insect immunity - Isolation from the lepidopteran Heliothis virescens of a novel insect defensin with potent antifungal activity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 274, no. 14, 2 April 1999 (1999-04-02), pages 9320-9326, XP002112857 BALTIMORE, US ISSN: 0021-9258 the whole document	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00843

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR 2695392	A	11-03-1994	NONE		
WO 9011770	A	18-10-1990	CA	2030779 A	12-10-1990
			EP	0425616 A	08-05-1991
FR 2725992	A	26-04-1996	NONE		
DE 2212854	A	02-11-1972	CH	568387 A	31-10-1975
			FR	2130267 A	03-11-1972
			GB	1355163 A	05-06-1974
WO 9730082	A	21-08-1997	FR	2745004 A	22-08-1997
			AU	1884397 A	02-09-1997
			CA	2245518 A	21-08-1997
			CN	1216047 A	05-05-1999
			EP	0882063 A	09-12-1998
			PL	328579 A	01-02-1999
EP 0307841	A	22-03-1989	AU	2487788 A	17-04-1989
			WO	8902437 A	23-03-1989
EP 0607080	A	20-07-1994	FR	2700338 A	13-07-1994



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No

PCT/FR 99/00843

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/82 A61K38/17 C12P21/02
C12N15/62 C12N15/81

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 695 392 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11 mars 1994 (1994-03-11) page 1, ligne 33 - page 7, ligne 2	1-4, 8, 11, 21, 22, 46
Y	---	13, 14, 25
X	WO 90 11770 A (CALGENE INC) 18 octobre 1990 (1990-10-18) page 1 - page 19	1-4, 8, 11, 17, 18, 21-24, 28-46
X	FR 2 725 992 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 26 avril 1996 (1996-04-26) cité dans la demande le document en entier	1-4, 8, 11, 21, 22

	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 août 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/09/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No

PCT/FR 99/00843

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHUNG K T ET AL.: "Antibacterial factors in immune hemolymph from <i>Heliothis virescens</i> larvae" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 96, no. 0, 19 mai 1996 (1996-05-19), page 275 XP002089180 WASHINGTON US abrégé	13,14,25
A	DE 22 12 854 A (WSESOJUSNYJ NAUTSCHNO) 2 novembre 1972 (1972-11-02) le document en entier	1,21,22,46
A	WO 97 30082 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 21 août 1997 (1997-08-21) le document en entier & FR 2 745 004 A cité dans la demande	1,21,22
A	EP 0 307 841 A (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 22 mars 1989 (1989-03-22) le document en entier	17,19,20,23,25,26,29,30,35,36
A	EP 0 607 080 A (TRANSGENE SA) 20 juillet 1994 (1994-07-20) page 2, ligne 28 - ligne 53	17-19
A	HOFFMANN J A ET AL.: "Insect defensins: inducible antibacterial peptides" IMMUNOLOGY TODAY., vol. 13, no. 10, 1992, pages 411-415, XP002089181 CAMBRIDGE GB le document en entier	1-46
P,X	LAMBERTY M ET AL.: "Insect immunity - Isolation from the lepidopteran <i>Heliothis virescens</i> of a novel insect defensin with potent antifungal activity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 274, no. 14, 2 avril 1999 (1999-04-02), pages 9320-9326, XP002112857 BALTIMORE, US ISSN: 0021-9258 le document en entier	1-25

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dém: Internationale No

PCT/FR 99/00843

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2695392	A	11-03-1994	AUCUN	
WO 9011770	A	18-10-1990	CA 2030779 A EP 0425616 A	12-10-1990 08-05-1991
FR 2725992	A	26-04-1996	AUCUN	
DE 2212854	A	02-11-1972	CH 568387 A FR 2130267 A GB 1355163 A	31-10-1975 03-11-1972 05-06-1974
WO 9730082	A	21-08-1997	FR 2745004 A AU 1884397 A CA 2245518 A CN 1216047 A EP 0882063 A PL 328579 A	22-08-1997 02-09-1997 21-08-1997 05-05-1999 09-12-1998 01-02-1999
EP 0307841	A	22-03-1989	AU 2487788 A WO 8902437 A	17-04-1989 23-03-1989
EP 0607080	A	20-07-1994	FR 2700338 A	13-07-1994



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovenie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

